

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



***Avaliação da viabilidade de produção de um  
reagente auxiliar envolvido no processo de  
fabrico de um API***

**Simão Gustavo Rosa Quaresma de Abreu**

Dissertação

VERSÃO PÚBLICA

**MESTRADO EM QUÍMICA TECNOLÓGICA**

2013



UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



***Avaliação da viabilidade de produção de um  
reagente auxiliar envolvido no processo de  
fabrico de um API***

**Simão Gustavo Rosa Quaresma de Abreu**

Dissertação

Versão Pública

**MESTRADO EM QUÍMICA TECNOLÓGICA**

Orientadores: Prof. Dr. Carlos Castro

Dra. Dália Barbosa

2013



*“I have not failed. I've just found 10,000 ways that won't work.”*

**Thomas A. Edison**



## **Agradecimentos**

Gostava de agradecer, inicialmente a toda a equipa de docentes que tem vindo a acompanhar o meu percurso na Faculdade de Ciências. Um muito obrigado à professora Maria José Lourenço por ter encontrado esta oportunidade, que me possibilitou estagiar na AtralCipan.

Em seguida quero agradecer a toda a equipa da Cipan que me acolheu no decorrer desta dissertação, desde o porteiro Marco que me deu boleia, as “Ana’s” das limpezas sempre com a sua boa disposição e grande sentido de humor, fizeram o dia-a-dia passar mais depressa. Aos meus colegas de gabinete João Manso e Carlos Anjo, sem eles ainda estaria a ultrapassar o nervosismo de um novo ambiente, assim como me ajudaram no início da minha preparação para este trabalho. Excelentes profissionais, aturaram-me imenso e só por isso merecem um louvor. Mas quando a conversa é política, cuidado.

Um obrigado ao Engº Joaquim Queiroga, Dra. Margarida Tavares, Engº Eduardo Antunes e ao Engº Pedro Quadrio pelo seu plano de indução a esta nova casa, ainda que tardiamente.

Ao Ricardo Figueiredo por acompanhar-me ao longo dos meus falhanços e sucessos, dando-me sempre dicas e conselhos para não me deixar ir abaixo.

Ao Álvaro e à Dra. Madalena e toda a equipe do controlo de qualidade.

À doutora Engª Mafalda pelas boleias preciosas nos dias de greve, obrigado vizinha.

Agradeço também ao Carlos Cunha e ao Zé Luis, pela ajuda e apoio contantes, com um grande sentido de humor, que me fizeram sentir em casa logo desde o primeiro dia, tornaram-se grandes confidentes, trataram-me como um filho/irmão mais novo. Fizeram de mim a coqueluche da Cipan.

Agradeço também aos meus orientadores, professor Carlos Castro e à Doutora Dália Barbosa, pelo interesse que demonstraram pelo meu trabalho acompanhando cada *milestone*, e aos meus pais que mesmo com o divórcio, conseguiram no meio de tudo mostrar o seu apoio nesta nova etapa.

Ao meu irmão Afonso e à Soraia, o seu apoio ao longo desta fase complicada, aos meus sobrinhos que com os seus sorrisos me eram capazes de esquecer tudo.

Às minhas colegas de mestrado, por todos os momentos de trabalho e galhofa passados juntos.

E estou imensamente grato, ao destino por ter dado as voltas que deu, por me ter trazido de volta a quem sempre pertenci.

Leonor não há palavras para descrever o quanto significas para mim, acompanhaste me desde o primeiro ano da faculdade e agora mais esta etapa sempre com o mesmo apoio incondicional. Fazes sobressair o melhor de mim, e sou-o contigo. És-me tudo.



## **Resumo**

O rápido aumento da resistência bacteriana e o lento desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos têm criado na comunidade científica uma grande preocupação com o presente e, especialmente, com o futuro do tratamento das infecções.

Desde a descoberta da clorotetraciclina, em 1945, e da tetraciclina, em 1953, têm sido conhecidas inúmeras tetraciclinas semissintéticas e naturais com atividade antibacteriana. No entanto, desde a descoberta da minociclina, no início dos anos 70, que não surgia nenhuma molécula desta classe, com atividade, o que originou, devido ao vasto uso destes agentes, o aparecimento de bactérias resistentes. Assim, apesar das tetraciclinas permanecerem como agentes terapêuticos para várias infecções, o aparecimento de bactérias resistentes limita o seu uso contra importantes agentes patogénicos.

O progresso deste projeto viu-se afetado devido à má qualidade de uma matéria-prima utilizada para a produção de um reagente auxiliar, matéria-prima\_1, quando comprado a fornecedores chineses. Foi então que se decidiu produzi-lo localmente.

Neste contexto o objetivo deste trabalho assentava em saber se a produção da matéria-prima deste reagente era viável, assim como participar na procura de novos métodos para a produção deste e usá-los para o fabrico da API\_1.

Foram testados novos métodos para a produção da matéria-prima necessária, assim como se procurou otimizar o método atual, este último qual foi possível tendo-se obtido resultados reprodutíveis com bom rendimento molar (76%), poupando em 24%, o uso dos reagentes.

Foram também avaliados vários sistemas de armazenamento do reagente auxiliar, tendo-se obtido uma maior estabilidade quando armazenado em sacos fechados a vácuo dentro de um pote de plástico.

Neste trabalho, foram desenvolvidos métodos igualmente eficientes e viáveis, promovidos por condições reacionais mais brandas e a temperatura ambiente, e económicos, em termos de tempo e energia, sendo possível produzir 3 a 4 vezes mais reagente auxiliar no mesmo período de tempo que pelo método atual.

A API\_1 obtida utilizando os vários reagentes auxiliares foi de alta qualidade, apresentando uma pureza elevada (99%), podemos ainda afirmar que é obtido com bons rendimentos (60-70%).

**Palavras-chave:** Tetraciclinas, API\_1, Cloretos de ácido, Estabilidade, Reagente\_13, Reagente\_12, Reagente\_14.

## Abstract

The rapid increase in bacterial resistance and the slow development of new antimicrobials has created a great concern in the scientific community for the present and especially the future treatment of infections.

Since the discovery of chlortetracycline in 1945, and tetracycline, in 1953, there have been numerous known semisynthetic and natural tetracyclines with antibacterial activity. However, since the discovery of minocycline in the early 70's, which presented no molecule in its class in activity, which caused due to the extensive use of these agents, the emergence of resistant bacteria. Thus, although the tetracyclines remain as therapeutic agents for various infections, the emergence of resistant bacteria limits its use against important pathogens.

The progress of this project has been affected due to poor quality of the auxiliary reagent's raw material, matéria-prima\_1, purchased from Chinese suppliers. It was then that was decided to produce this reagent locally.

In this context, the objectives of this work was based on whether the production of raw material of the auxiliary reagent was viable, as well as participate in the search for new methods for the production thereof and use them for the manufacture of API\_1

New methods were tested for the production of the raw material required, the present method was optimized, this last one was possible to achieve as we obtained reproducible results with good molar yield (76%) saving up to 24% of the reagents.

We also evaluated several storage systems for the auxiliary reagent, acid chloride, and a higher stability was found when stored in sealed bags under vacuum in a plastic pot.

In this work, methods have been developed efficient and feasible also promoted by milder reaction conditions at room temperature, and economical in terms of time and energy, it is possible to produce 3 to 4 times more auxiliary reagent for the same period of time that in the current method .

The API\_1 obtained using various auxiliar reagents was of high quality, showing high purity values (99%) and with good yields (60-70%).

**Keywords:** Tetracyclines, API\_1, Acid Chlorides, Stability, Reagente\_13, Reagente\_12, Reagente\_14.

## Índice

Agradecimentos .....	i
Resumo .....	iii
Abstract.....	v
Índice de Figuras.....	ix
Índice de Esquemas .....	x
Índice de Tabelas .....	xi
Lista de Abreviaturas .....	xii
Capítulo 1   INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Indústria Farmacêutica .....	1
1.2 Portugal.....	5
1.3 Cipan.....	7
1.3.1 Tetraciclinas .....	8
1.4 Formação da ligação amida – Estado de arte (18) (19) (20) (21).....	8
1.4.1 Haletos de acilo .....	8
1.4.2 Azida de acilo.....	16
1.4.3 Anidridos de ácido .....	18
1.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência .....	20
1.5.1 Cromatografia de fase normal .....	22
1.5.2 Cromatografia de fase reversa.....	22
1.5.3 Cloretos de ácido em HPLC.....	24
1.6 Espectroscopia de infravermelho .....	26
Capítulo 2   APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS .....	28
2.1 Preparação da matéria-prima para o reagente auxiliar .....	28
2.1.1 Adaptações ao método actual.....	28
2.1.2 Métodos Alternativos .....	31
2.2 Produção do reagente auxiliar .....	34
2.2.1 Ensaio de estabilidade .....	37

2.2.2 Métodos alternativos .....	40
Capítulo 3   ESTUDO DA VIABILIDADE ECÓNOMICA .....	48
3.1 Gastos Laboratoriais .....	48
3.2 Balanço Energético .....	49
3.3 Viabilidade económica .....	54
Capítulo 4   AMBIENTE E SEGURANÇA .....	58
Capítulo 5   CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS .....	60
Capítulo 6   PARTE EXPERIMENTAL.....	61
6.1 Material e Reagentes .....	61
6.2 Sínteses .....	61
6.2.1 Matéria-prima_1 .....	61
6.2.2 Intermediário_1 .....	62
6.2.3 Anidrido mistos .....	62
6.2.4 Reação de Appel .....	62
6.2.5 Teste de desempenho .....	62
6.2.6 API_1 bruta .....	63
6.2.7 API_1 Pura .....	63
Bibliografia .....	A

## Índice de Figuras

Figura 1- Exportação de produtos Portugueses em Milhões de €.....	6
Figura 2 - Ordem de reatividade de derivados de ácidos carboxílicos (ordem decrescente). ....	9
Figura 3- Esquema representativo do funcionamento de um HPLC. ....	21
Figura 4 - Princípio de cromatografia de fase reversa com gradiente de eluição. ....	23
Figura 5 - Primeiro passo reacional para a produção do matéria-prima_1 .....	49
Figura 6 - Ultimo passo reacional para a produção do matéria-prima_1 .....	49
Figura 7 - Formação do intermediário_1 pelo Reagente_7 .....	49
Figura 8 – Formação do intermediário_1 pelo sistema reagente_13/agente clorante	49

## Índice de Esquemas

Esquema 1 - Reação de acilação utilizando tricloreto de fosforo.....	9
Esquema 2 - Reação secundaria indesejada.....	10
Esquema 3 - Reação com pentacloreto de fósforo.....	10
Esquema 4 - Mecanismo de reação com cloreto de tionilo e cloreto de oxalilo.....	11
Esquema 5- Formação do intermediário Vilsmeier-Haack e o seu ciclo catalítico...	11
Esquema 6 - Mecanismo de reação utilizando Cloreto Cianúrico.....	12
Esquema 7 - Mecanismo da reação de Appel. ....	13
Esquema 8 - Acilação proposta por Skydow. ....	13
Esquema 9- Uso do reagente de Ghosez.....	14
Esquema 10 - Método de acilação com 3,3-diclorociclopropeno.....	14
Esquema 11 - Formação do Fluoreto de acilo utilizando TFFH.....	16
Esquema 12 - Formação do brometo de acilo com PPH3 e NBS.....	16
Esquema 13 - Formação da azida de acilo.....	17
Esquema 14 - Rearranjo de Curtius. ....	17
Esquema 15 - Preparação da azida por DPPA. ....	17
Esquema 16 - Preparação do anidrido com DCC .....	18
Esquema 17 - Acoplamento de uma amina com o anidrido .....	19
Esquema 18 - Regioseletividade da adição nucleofilica.....	19
Esquema 19- Preparação do anidrido etilcarbónico .....	19
Esquema 20 - Esquema reacional da preparação do Matéria-prima_1.....	29
Esquema 21 - Esquema reacional da monocarboximetilação de aminas primárias. .	31
Esquema 22 - Mecanismo da reação da produção do intermediário_1 partindo do matéria-prima_1.....	35
Esquema 23- Mecanismo reacional para a formação do anidrido misto. R= Et, Bz .	40
Esquema 24 - Reação de esterificação.....	50
Esquema 25 - Formação do Produto_secundário_1. ....	51
Esquema 26 - Reação entre ácido acético e o sistema de reagente_13 / reagente_14	52



## Índice de Tabelas

Tabela 1- Condições experimentais.....	29
Tabela 2 - Condições experimentais para a monocarboximetilação de aminas primárias. ....	33
Tabela 3- Condições reacionais para a preparação do reagente auxiliar. ....	37
Tabela 4 - Condições e resultado do primeiro teste de estabilidade. ....	38
Tabela 5 - Condições e resultado do segundo ensaio de estabilidade. ....	39
Tabela 6 - Condições reacionais e resultados obtidos. ....	42
Tabela 7 - Condições reacionais e resultados obtidos. ....	44
Tabela 8 - Estimativa do custo associado a todos os reagentes face às quantidades utilizadas. ....	48
Tabela 9 - Valores médios de energias de ligação em kJ/mol (67) ....	50
Tabela 10 - Legislação principal de segurança. ....	59

## Lista de Abreviaturas

°C	Graus Celsius
a.C.	Antes de Cristo
AICEP	Agência para o Investimento e Comércio Externo de Portugal
API	Princípio ativo, do inglês <i>Active Pharmaceutical Ingredient</i>
APIFARMA	Associação <b>P</b> ortuguesa da <b>I</b> ndústria <b>F</b> armacêutica
Bz	<b>B</b> enzilo
CB <sub>4</sub>	Tetrabrometo de carbono
CCl <sub>4</sub>	Tetracloroeto de carbono
CCNCl <sub>3</sub>	Tricloroacetnitrilo
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
CIPAN	<b>C</b> ompanhia <b>I</b> ndustrial <b>P</b> rodutora de <b>A</b> ntibióticos
Cl <sub>3</sub> CCONH <sub>2</sub>	Tricloroacetamida
COCl <sub>2</sub>	Fosgénio
(COCl) <sub>2</sub>	Cloreto de oxalilo
d.C	Depois de Cristo
DCC	Diciclo-hexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
DIPEA	<b>Di-isopropiletilamina</b>
DMPU	1,3-dimetil-3,4,5,6-tetra hidro-2 (1H) pirimidona
DMF	<b>D</b> imetilformamida
DPPA	Difenilfosfina de azida, do inglês, <b>diphenylphospine azide</b>
Et	<b>E</b> tilo
Et <sub>3</sub> N	Trietilamina
EUA	<b>E</b> stados <b>U</b> nidos da <b>A</b> mérica
FDA	<i><b>F</b>ood and <b>D</b>rug <b>A</b>ministration</i>
FMI	<b>F</b> undo <b>M</b> onetário <b>I</b> nternacional
HCl	Ácido clorídrico
HNO <sub>3</sub>	Ácido nítrico
H <sub>2</sub> N-NH <sub>2</sub>	Hidrazina

HONO	Ácido nitroso
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta eficiência, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido Sulfúrico
H <sub>2</sub> O	Água
ICEP	Instituto do Comércio Externo de Portugal
I&D	Investigação e Desenvolvimento
INFARMED	Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento
IPr <sub>2</sub> NEt	Di-isopropiletilamina
ISO	Organização Internacional para Padronização, do inglês <i>International Organization for Standardization</i>
LC	Cromatografia Líquida, do inglês <i>Liquid Chromatography</i>
MeOH	Metanol
MHRA	<i>Medicines and Healthcare products Regulatory Agency</i>
NaI	Iodeto de sódio
NATO	Organização do Tratado do Atlântico Norte, do inglês <i>North Atlantic Treaty Organization</i>
NBS	N-bromosuccinimida
(NCCl) <sub>3</sub>	Cloreto cianúrico
NHS	Serviço Nacional de Saúde, do inglês, <i>National Health Service</i>
OCDE	Organização de Cooperação e Desenvolvimento Económico
OHSAS	<i>Occupational Health and Safety Advisory Services</i>
PALOP	Países Africanos de Língua Oficial Portuguesa
PCl <sub>3</sub>	Tricloreto de fósforo
PCl <sub>5</sub>	Pentacloreto de fósforo
PDA	<i>Photo diode array</i>
p.e	Por exemplo
pH	Potencial de hidrogénio
PPh <sub>3</sub>	Trifenilfosfina
POCl <sub>3</sub>	Cloreto de fosforilo
REACH	<i>Registration, Evaluation, Authorisation, and Restriction of Chemicals</i>
Rh	Ródio

r.t	Temperatura ambiente, do inglês <i>room temperature</i>
SOCl <sub>2</sub>	Cloreto de Tionilo
TFFH	N,N-Tetrametilfluoroformamidínio hexafluorofosfato
UV/Vis	Espectroscopia de Ultravioleta-Visível

## Capítulo 1 | INTRODUÇÃO

### 1.1 Indústria Farmacêutica

Enquanto a revolução científica do século XVII difundiu ideias de racionalismo e experimentação, a revolução industrial transformou a produção de bens no final do século XVIII, o casamento dos dois conceitos para o benefício da saúde humana foi um desenvolvimento relativamente tardio.

A Merck na Alemanha foi, possivelmente, a primeira empresa a mover-se nessa direção. A farmácia fundada em Darmstadt, em 1668, foi apenas em 1827 que Heinrich Emanuel Merck começou a transição em direção a um interesse industrial e científico (1).

A origem da GlaxoSmithKline é rastreável à data de 1715, mas foi apenas em meados do século XIX, que Beecham se envolveu na produção industrial de medicamentos patenteados a partir de 1842 (2).

Nos EUA, a Pfizer fundada em 1849, era inicialmente uma empresa de química fina, tendo-se expandido rapidamente durante a guerra civil americana com a demanda de analgésicos e anti-sépticos.

Um jovem químico farmacêutico e comandante de cavalaria, chamado Coronel Eli Lilly, criou de uma empresa farmacêutica em 1876. Ele foi um pioneiro de novos métodos no setor, sendo um dos primeiros a concentrar-se na investigação e desenvolvimento (I & D).

Outro militar foi Edward Robinson Squibb, que montou um laboratório em 1858, para, assim como a Pfizer, fornecer exércitos da União na guerra civil e estabelecer a base para a Bristol-Meyers Squibb (BMS) de hoje (3).

Na Suíça desenvolveu-se rapidamente uma indústria farmacêutica na segunda metade do século XIX. Inicialmente envolvidos no comércio de têxteis e corantes, os fabricantes notaram que os seus corantes tinham propriedades antissépticas, começando a comercializá-los como produtos farmacêuticos (4).

Não foram apenas as empresas suíças que tinham as suas raízes no comércio de corantes, seguiram o exemplo empresas tais como Sandoz, Ciba-Geigy, Roche.

A Bayer foi fundada em 1863 como um fabricante de tintura em Wuppertal. Mais tarde mudou-se para medicamentos, iniciando a comercialização de aspirina por volta do início do século XX, um dos medicamentos de maior sucesso nesse ponto.

As rivalidades nacionais e conflitos que caracterizaram este período também tiveram o seu impacto sobre a indústria de desenvolvimento, a Bayer tinha a marca registrada da aspirina e viu os seus ativos norte-americanos apreendidos durante a Primeira Guerra Mundial, enquanto a Merck (Merck & Co. agora nos EUA ou Merck Sharp & Dohme [MSD]), foi-se gradualmente separando da empresa-mãe na Alemanha (Merck KGaA). Bayer teve a sua filial na Rússia apreendida durante a revolução russa. A guerra perturbou a posição da Alemanha como líder em produtos farmacêuticos no início do século XX fazendo com que outros, especialmente os EUA, pudessem levar uma vantagem relativa. Os primórdios da globalização da indústria foram vistos antes e depois da guerra - no Reino Unido, os direitos de importação incentivaram muitas empresas estrangeiras como a Wyeth, a Sandoz para criar subsidiárias na Grã-Bretanha no pós-guerra.

Os anos entre guerras marcaram dois avanços que previam a chegada da indústria farmacêutica como a conhecemos hoje. O primeiro foi a insulina para o tratamento da diabetes, até então uma doença fatal. Com a colaboração de cientistas da Eli Lilly foi possível purificar o extrato, produzir a nível industrial e distribuí-lo como um remédio eficaz.

O segundo foi a penicilina, esta teve um impacto inigualável por qualquer outro medicamento. Após a descoberta inicial de Alexander Fleming das propriedades antibióticas do fungo *penicillium* em 1928, uma colaboração apoiada pelo governo internacional, incluindo a Merck, Pfizer e Squibb, trabalhou na produção em massa deste medicamento durante a Segunda Guerra Mundial, salvando milhares de soldados.

A escala e sofisticação do esforço no desenvolvimento da penicilina marcou uma nova era para a forma como a indústria farmacêutica desenvolve medicamentos.

Após a guerra, a chegada dos sistemas de saúde sociais, tais como no Reino Unido, o *National Health Service* (NHS) criou na Europa, um sistema muito mais estruturado, tanto para a prescrição de medicamentos como no seu reembolso. Em 1957, o NHS trouxe o que era essencialmente um sistema de fixação de preços para

permitir retorno razoável sobre o investimento para os fabricantes, solidificando o incentivo para investir em novos medicamentos. Este vem dar um papel mais importante ao Estado na área da saúde.

Este movimento foi acompanhado em ambos os lados do Atlântico em regulação governamental crescente de produção de medicamentos.

Nos anos 1960s várias tentativas foram feitas pelo *Food and Drug Administration* (FDA) nos EUA para aumentar a regulamentação das indústrias farmacêuticas e limitar as ligações financeiras entre empresas e os médicos que prescreviam os medicamentos.

Depois do escândalo talidomida de 1961, a *World Medical Association* promoveu o aumento da regulamentação e testes às drogas antes do licenciamento, com uma nova emenda às regras da FDA, regras que exigem comprovação da eficácia e divulgação precisa de efeitos colaterais de medicamentos novos (a emenda de Harris Kefauver) a ser implementado em 1962 (5). Da mesma forma, a Declaração de Helsínquia 1964 colocou maiores restrições éticas na pesquisa clínica, claramente cimentando a diferença entre a produção de medicamentos de prescrição e outros produtos químicos.

Através de métodos mais racionais de produção em massa e com o aumento da compreensão da biologia e da química habilitou a que os candidatos a novos fármacos fossem escolhidos de forma sistemática e não ao acaso. Essa "idade de ouro" do desenvolvimento de fármacos ocorreu no pós-guerra, um contexto geral de enormes melhorias nos padrões de vida, otimismo tecnológico e o aumento da competitividade caracterizaram os anos 40 até aos anos 70. Como as barreiras à entrada na produção de fármacos foram levantadas, a indústria consolidou-se. Da mesma forma, os processos de internacionalização começaram antes da guerra foram continuados - em 1951 a Pfizer abriu filiais em nove novos países (3).

A lista de novos medicamentos a partir do pós-guerra foram um marco importante desde a pílula contraceptiva, lançada em 1960, que teve um impacto na sociedade quase tão importante como o da penicilina, permitindo às mulheres controlarem efetivamente a sua fertilidade e favorecer a igualdade sexual pela primeira vez. O Valium® (diazepam) foi introduzida no mercado pela Roche em 1963, seguindo-se a introdução de diferentes classes de antidepressivos e

antipsicóticos, como o haloperidol. Estas drogas inauguraram uma nova era de tratamento psiquiátrico. A década de 1970 proporcionou uma onda de medicamentos contra o cancro, um relatório recente do *Cancer Research UK*, Reino Unido, mostrou que as taxas de sobrevivência duplicaram desde os anos 70 - em grande parte devido à inovação maciça em medicamentos específicos para oncologia (6).

Inibidores da enzima de conversão da angiotensina (ECA) chegaram em 1975, melhorando a saúde cardíaca. O paracetamol e ibuprofeno foram desenvolvidos em 1956 e 1969, respetivamente.

Controlos regulamentares mais rígidos foram introduzidos na década de 70, estes revogavam as patentes permanentes e estabeleceram prazos fixos sobre a proteção de patentes para produtos de marca. Em 1977, Tagamet®, um remédio para a úlcera, tornou-se o primeiro medicamento *blockbuster*, ganhando os seus fabricantes mais de 1 bilhão de dólares por ano e os seus criadores o Prémio Nobel. Isto marcou um novo ponto de partida de competitividade entre empresas. Eli Lilly lançou o primeiro inibidor seletivo da recaptação da serotonina, Prozac®, em 1987, que veio mais uma vez revolucionar a prática da saúde mental.

Como resultado, as indústrias floresceram produzindo produtos genéricos e ganhando grandes lucros, pois os fabricantes de genéricos não incorreram no custo de descoberta de drogas. (Um medicamento genérico é um medicamento cuja patente expirou).

Mas enquanto houve alguns avanços, a enorme despesa e riscos envolvidos na investigação e desenvolvimento (I&D) fez com que muitas empresas simplesmente imitassem os seus concorrentes, tentando obter um corte de *market-share*, em vez de investir em novas medicações inovadoras. Os críticos da indústria farmacêutica sugerem que os medicamentos "*me too*" (droga que é estruturalmente muito semelhante às drogas já conhecidas, com apenas pequenas diferenças) só são trazidos para o mercado, pois o seu desenvolvimento é mais barato e menos arriscado do que as drogas com um novo mecanismo de ação (7).

No entanto, os defensores apontam para os benefícios de custo da concorrência de mercados entre os medicamentos similares. Além disso, pode levar 10 anos ou mais para que um medicamento, desde a sua descoberta, seja aprovado pela FDA



Por exemplo, a popular bomba inibidora de prótons, Nexium (esomeprazol) da AstraZeneca, lançado em 2001, é meramente uma versão isomérica purificada de um medicamento mais antigo que perdeu a proteção da patente.

Patentes, ou a falta delas, tornou-se um problema para a indústria. A Lei Hatch-Waxman de 1984 (8) vem regularizar a produção de genéricos nos EUA. O foco da indústria era agora, o *marketing*, para manter a quota de mercado, nos *lobbies* políticos para proteger os interesses comerciais e nos advogados para impor reivindicações legais sobre direitos de propriedade intelectual.

As novas tecnologias são o que realmente prometem um futuro positivo para a indústria no século XXI. Computação e biotecnologia têm permitido grandes avanços tanto no desenvolvimento, como na produção de novos medicamentos. A automatização do processo de descoberta de novos fármacos e a informatização do genoma têm permitido avanços a uma taxa muito maior do que anteriormente, permitindo assim uma gama totalmente nova de medicamentos muito mais específicos que podem ter impacto sobre a saúde humana, tanto quanto os medicamentos do século passado.

### 1.2 Portugal

Portugal encontra-se estrategicamente localizado entre a Europa, América e África. Desfruta de privilegiadas relações políticas, económicas, diplomáticas e comerciais em todo o mundo. É um membro da Organização de Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE), o Fundo Monetário Internacional (FMI) e da NATO (*North Atlantic Treaty Organization*) (9).

Portugal oferece à indústria excelentes recursos humanos científicos, infra-estruturas modernas (laboratórios, plantas-piloto e parques tecnológicos), instalações industriais do mais alto nível e apoio comprometido do governo.

O setor da indústria farmacêutica é o ramo da indústria química que apresenta, atualmente, os maiores índices de crescimento em investimentos e pesquisa, juntamente com os valores mais elevados de produção. É também o setor mais fortemente regulamentado tanto em termos comerciais como industriais.

Em Portugal, este setor emprega cerca de 9.580 trabalhadores, é dominado por gigantes multinacionais, a maioria dos quais já exportam produtos acabados,

chegando mesmo a serem o segundo produto mais exportado de Portugal (Figura 1), alcançado um volume de exportações de 593 milhões em 2011, com um volume de negócios de 1.300 milhões de euros.

Portugal tem uma reputação de possuir mão-de-obra competente e de confiança neste setor, formado por universidades que estão em sintonia com os avanços científicos e tendências de mercado.

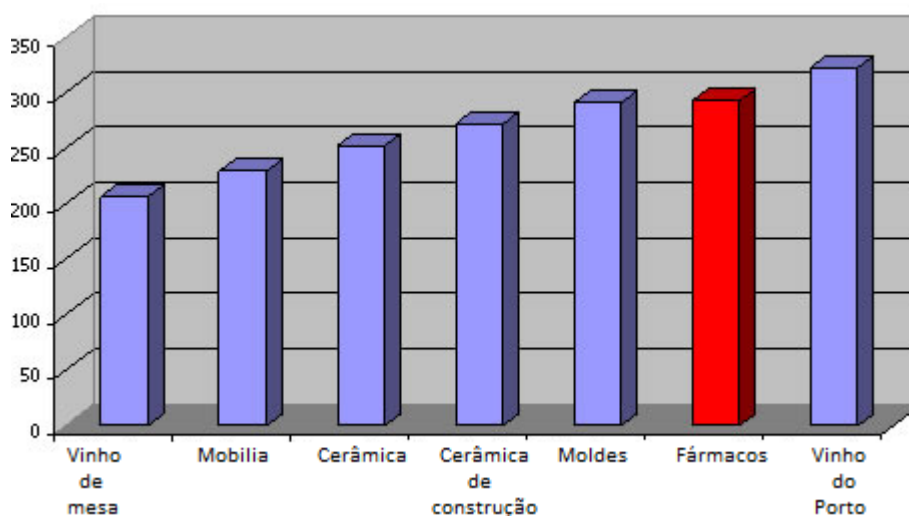


Figura 1- Exportação de produtos Portugueses em Milhões de €<sup>1</sup>.

Portugal representa 2% do mercado farmacêutico na Europa (10), com um total de 130 empresas farmacêuticas, das quais 33 têm instalações de produção, e cerca de 347 armazéns de medicamentos.

Em resposta à diminuição de exportação observada entre 1999 a 2003 um certo número de empresas farmacêuticas portuguesas juntamente com a AICEP (Agência para o Investimento e Comércio Externo de Portugal), resultante da fusão da agência portuguesa para o investimento e o Instituto do Comércio Externo de Portugal (ICEP), a Associação Português da Indústria Farmacêutica (APIFARMA) e o Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento (INFARMED) criaram uma associação estratégica, a "PharmaPortugal". Esta procura promover e aumentar as exportações, bem como a internacionalização da indústria farmacêutica Portuguesa, contribuir para aumentar o valor dos produtos e serviços da cadeia de valor e maior

<sup>1</sup> Fonte:ICEP/INE 2003

uso de I&D (obtida pela cooperação entre empresas/universidades), bem como criar e divulgar uma imagem de modernidade e qualidade que atendam aos mais altos padrões internacionais.

Graças a esta iniciativa verificou-se um aumento constante das exportações de cerca de 18.2% em 2007, tendo como principais mercados Países PALOP (Países Africanos de Língua Oficial Portuguesa), Maghreb (zona noroeste de Africa), América latina entre outros (11).

Nesta iniciativa encontramos empresas como a Bial, Bluepharma, que ganhou o prémio PME Inovação COTEC-BPI 2012, e o grupo AtralCipan.

Esta dissertação foi realizada nos laboratórios de I&D da Cipan.

### 1.3 Cipan

O Grupo arrancou com os Laboratórios ATRAL em princípios de 1948, a partir de uma farmácia, em Alcântara, cuja situação financeira no balanço de 1947 era de falência técnica. Os mercados da África e da Ásia apresentavam oportunidades inexploradas na área da farmacêutica, cujo desenvolvimento tinha sido facilitado e incrementado pelas carências que a guerra mundial provocara, onde a concorrência era praticamente nula.

A contratação de técnicos especializados levou ao aumento do volume de faturação, iniciando um forte movimento de exportação que percorreu todos os continentes. Face às contínuas necessidades de matérias-primas e princípios ativos (API's – Active Pharmaceutical Ingridient, na sigla inglesa), é proposto o seu próprio fabrico em 1956. Dois anos depois os projetos ganham aprovação da FDA, tendo estes sido executados em 1962, levando à montagem de novas instalações fabris do setor de especialidades farmacêuticas. Um ano mais tarde é concluído o complexo fabril da CIPAN (Companhia Industrial Produtora de Antibióticos) tornando possível a produção dos princípios ativos dos seus medicamentos.

A Cipan é a empresa do grupo responsável pela produção de princípios ativos para a indústria farmacêutica, com especial destaque para o fabrico de antibióticos. A Cipan foi inaugurada no dia 14 de Outubro de 1965 e inspecionada pela primeira vez pela FDA no final desse ano. Os aspetos da qualidade são, desde sempre, fulcrais nas atividades de produção da empresa, para o cumprimento dos diversos requisitos

regulamentares. Para além do sucesso obtido junto da FDA, a Cipan labora sobre aprovação do INFARMED do MHRA e de diversas entidades reguladoras internacionais.

O INFARMED permite a venda e exportação dos seus produtos e a FDA permite a venda nos EUA. O mercado americano representa 74% dos 96% de produtos exportados em 2010.

Nesse mesmo ano a Cipan implementa o Sistema de Gestão Integrado (SGI) de Qualidade, Ambiente e Segurança segundo as normas ISO 9001:2000 (Qualidade), ISO 14001:2004 (Ambiente), OHSAS 18001:2007 (Segurança) e o Guia de boas práticas de fabrico da UE (EU guidelines to GMP medicinal products for Human and Veterinary use) (12).

A Cipan procedeu, dentro dos prazos, ao pré-registo de todas as substâncias aplicáveis, desde as matérias-primas importadas, produtos e sub-produtos e substâncias recuperadas, no âmbito do Regulamento (CE) nº1907/2006 (REACH-Registration, Evaluation, Authorisation, and Restriction of Chemicals).

Em Fevereiro deste presente ano a Cipan recebe o “Establishment Investigation Report” relativo à inspeção da FDA, ocorrida em Dezembro de 2011, onde as respostas dadas pela equipa foram consideradas satisfatórias e considerou a empresa apta para a produção e venda de API's para os EUA.

### **1.3.1 Tetraciclinas**

CONFIDENCIAL

## **1.4 Formação da ligação amida – Estado de arte (12) (13) (14) (15)**

### **1.4.1 Haletos de acilo**

#### **1.4.1.1 Cloreto de acilo**

O reagente auxiliar trata-se de um cloreto de acilo, também denominado cloreto de ácido, isto é, um derivado de um ácido carboxílico quando o grupo hidroxilo, -OH, é substituído por um cloro. Devido à sua força eletrofílica, os cloretos de ácido podem ser facilmente convertidos em praticamente todos os outros derivados de

acilo, representam meios poderosos para conseguir a ativação e funcionalização de ácidos carboxílicos.

De todos os derivados é o mais reativo (figura 4), no entanto são fáceis de se obter. Estes são amplamente utilizados na síntese orgânica como intermediários para a síntese de amidas, ésteres, cetonas, álcoois, péptidos, etc.

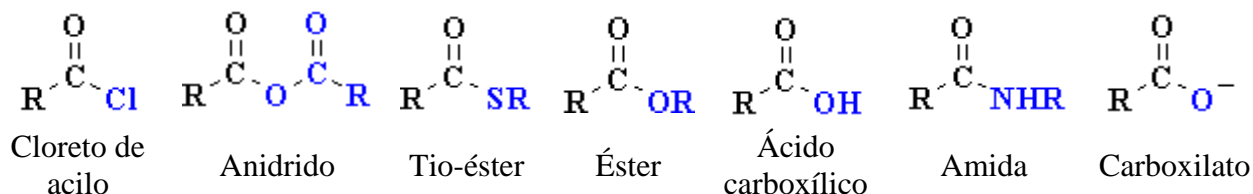
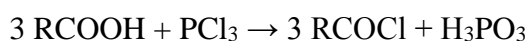


Figura 2 - Ordem de reatividade de derivados de ácidos carboxílicos (ordem decrescente).

A formação deste tipo de intermediários tem sido investigada exaustivamente, existindo uma vasta variedade de reagentes clorantes identificados na literatura, desde a utilização de cloreto de tionilo ( $\text{SOCl}_2$ ) (16), fosgênio ( $\text{COCl}_2$ ) (17), cloreto de oxalilo ( $(\text{COCl})_2$ ) (18), tricloreto de fósforo ( $\text{PCl}_3$ ), pentacloreto de fósforo ( $\text{PCl}_5$ ) (19), cloreto de fosforilo ( $\text{POCl}_3$ ) (20), cloreto cianúrico ( $(\text{NCCl})_3$ ), entre outros. Alguns serão aqui esquematizados.

Os cloretos de ácido, em particular os de série alifática de peso molecular elevado, são usualmente obtidos fazendo reagir o respetivo ácido carboxílico com tricloreto de fósforo de acordo com o esquema 6.

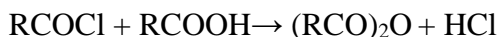


Esquema 1 - Reação de acilação utilizando tricloreto de fosforo.

Durante o curso da reação, ocorre uma separação de fases entre o ácido fosfórico e o cloreto de ácido formado.

No entanto, esta reação não é completa à temperatura ambiente mesmo com um excesso de tricloreto de fósforo e permitindo que a mistura decorra durante um tempo considerável (vários dias), a reação ainda está longe de ser completa.

Se a mistura reacional for submetida a calor, promoverá reações secundárias indesejadas levando à formação de fósforo elementar e formando anidridos de ácido, esquema 7.



**Esquema 2 - Reação secundária indesejada.**

Os cloretos de ácido podem também ser produzidos por reação com pentacloreto de fósforo, esquema 8.



**Esquema 3 - Reação com pentacloreto de fósforo.**

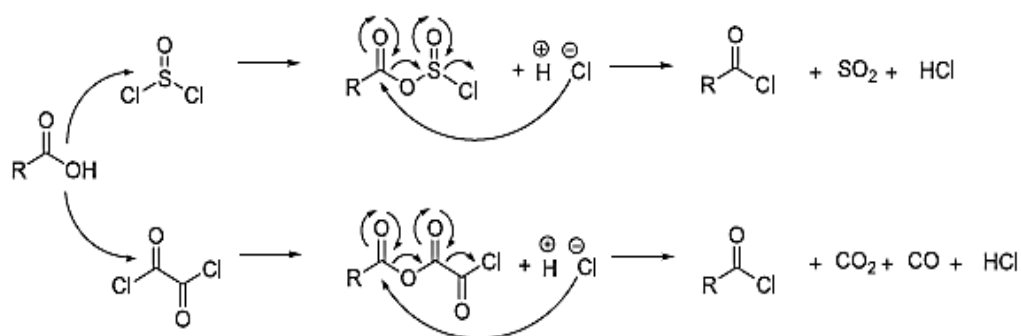
Embora esta reação se dê mais completamente, requer a utilização de uma quantidade relativamente grande do agente clorante. Além disso, o cloreto de fosforilo formado na reação é miscível com o cloreto de ácido e uma separação física não é possível. A separação por destilação é cara e insatisfatória (21).

$\text{PCl}_5$  é geralmente utilizado para a formação de ácidos aromáticos. O anel aromático retira os elétrons fazendo com que não reajam prontamente com o  $\text{SOCl}_2$ .

$(\text{COCl})_2$  e  $\text{SOCl}_2$  reagem de modo semelhante (esquema 9), no entanto é necessário cautela na sua utilização devido à formação de gases perigosos.

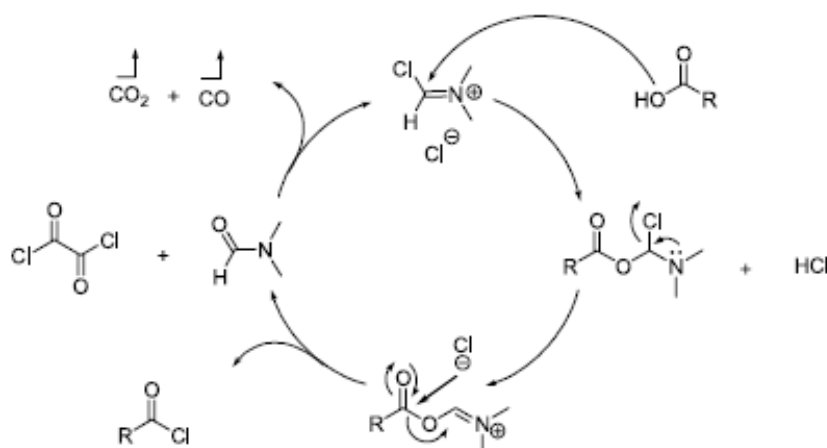
O  $\text{SOCl}_2$  é o agente clorante mais utilizado para a formação de cloretos de ácido pois pode ser utilizado em excesso, permite identificação do ponto final da reação pelo término da libertação de gases, tornando também a purificação do produto final mais fácil por concentração, podendo ser destilado e reutilizado futuramente.

Embora o cloreto de tionilo seja o reagente mais utilizado para a preparação de cloretos de ácido, o cloreto de oxalilo é normalmente uma boa alternativa, e, em alguns casos, apenas o cloreto de oxalilo é particularmente adequado para substratos sensíveis. Geralmente, as reações que empregam cloreto de oxalilo são realizadas à temperatura ambiente. O Cloreto de oxalilo e cloreto de tionilo têm pontos de ebulição semelhantes, havendo pouca diferença na conveniência do processamento. No entanto o cloreto de oxalilo é mais caro que o tionilo, o que diminui a sua procura para preparações a larga escala.



Esquema 4 - Mecanismo de reação com cloreto de tionilo e cloreto de oxalilo.

Estas reações são usualmente promovidas utilizando algumas gotas de dimetilformamida (DMF), formando um intermediário de cloreto de clorometileno(dimetilamônio) que é utilizado como catalisador, também denominado reagente de Vilsmeier-Haack, esquema 10 (22).



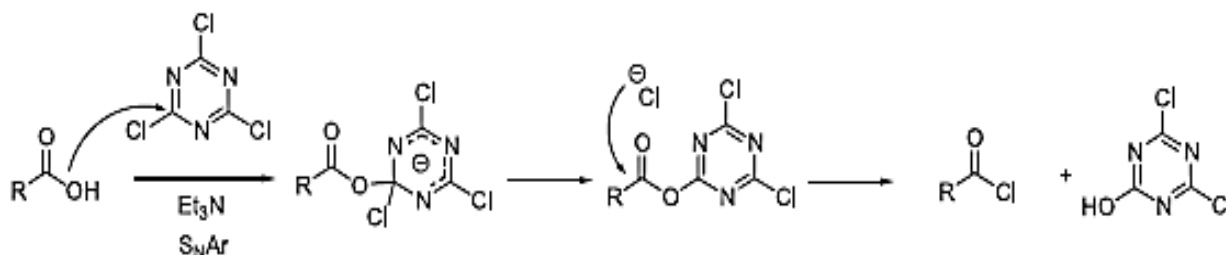
Esquema 5 - Formação do intermediário Vilsmeier-Haack e o seu ciclo catalítico.

Este procedimento oferece várias vantagens, incluindo condições de reação suaves, rendimentos elevados, utilizando apenas doses catalíticas de DMF e métodos simples de isolamento do produto.

A utilização de  $SOCl_2$  pode apresentar desvantagens quando se utilizam substratos sensíveis a condições ácidas devido à libertação de ácido clorídrico ( $HCl$ ).

Este pode ser evitado pela utilização do cloreto cianúrico (2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina) para levar a cabo a formação de cloreto de ácido na presença de trietilamina

(NEt<sub>3</sub>) (23). A presença desta base orgânica mantém as condições de pH básico em toda a reação. O mecanismo proposto envolve uma substituição nucleofílica aromática inicial, que gera o correspondente éster aromático ativado e o anião de cloro. O passo seguinte é o ataque nucleofílico do anião cloreto sobre o éster ativado para gerar o cloreto de ácido desejado, esquema 11.



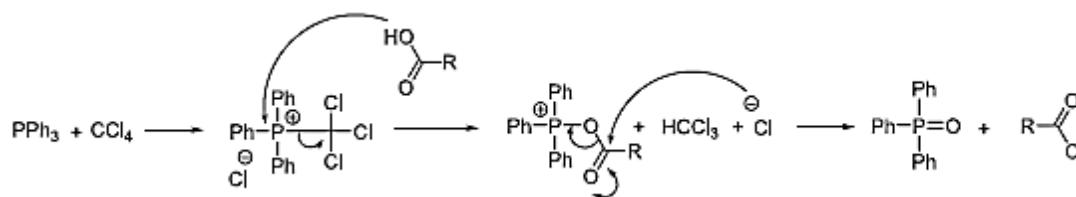
Esquema 6 - Mecanismo de reação utilizando Cloreto Cianúrico.

Como podemos observar pelo esquema anterior, podemos utilizar um excesso do ácido carboxílico, três equivalentes, visto que o cloreto cianúrico pode efetuar até três substituições, o que maximiza a utilização de reagentes e diminui a geração de subprodutos.

O cloreto cianúrico é um agente de ativação adequado para a fabricação em larga escala. O subproduto de ácido cianúrico resultante pode ser facilmente removido por meio de filtração e lavagem com uma base. O cloreto cianúrico é convertido num diclorohidróxido ou num clorodihidróxido de triazina insolúvel.

Condições neutras também têm sido desenvolvidas de modo a fornecer a conversão suave do ácido carboxílico no cloreto de ácido respectivo. Sistemas de trifetilfosfina (PPh<sub>3</sub>) com uma fonte de cloreto têm sido estudadas. Os ácidos carboxílicos são convertidos pelo par, PPh<sub>3</sub> e tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>) no cloreto de ácido correspondente, seguindo uma reação análoga à reação de Appel (24). É sugerido dar-se a formação inicial do cloreto trifeniltriclorometilfosfônio, prosseguindo a reação, produzindo-se clorofórmio e cloreto trifenilaciloxifosfônio, esquema 12.

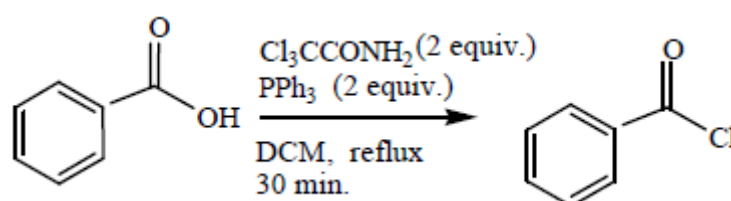




Esquema 7 - Mecanismo da reação de Appel.

A toxicidade e os riscos ambientais associados com  $\text{CCl}_4$ , tornam este processo menos atrativo. No período 1980 - 1990, quando  $\text{CCl}_4$  era usado sem restrições, as concentrações atmosféricas chegavam a valores como  $0,5\text{-}1,0 \text{ g/m}^3$  (25). Na parte inferior da atmosfera, este não oxida nem fotodegrada a um grau apreciável, podendo ser transportado para a estratosfera. O tempo médio de vida de  $\text{CCl}_4$  na atmosfera é de 45-50 anos (26). Na estratosfera, a radiação UV leva a uma fissão homolítica de uma ligação C-Cl para criar radicais cloro, que entram no ciclo de reação conhecida com o ozono, listado como um depletor de classe 1. Devido às disposições do Protocolo de Montreal de 1986, relativo às substâncias que empobrecem a camada de ozono, e suas alterações posteriores, o tetracloreto de carbono foi descontinuado em muitas áreas. Este solvente pode ser substituído por hexacloroacetona. Foi demonstrado (27) que os ácidos carboxílicos podem ser convertidos por hexacloroacetona e  $\text{PPh}_3$  a baixa temperatura para o correspondente cloreto de ácido.

De modo semelhante foram encontrados diferentes pares reacionais como tricloroacetonnitrilo/ $\text{PPh}_3$  para a acilação de ácidos carboxílicos. Recentemente, Skydow *et al.* introduziu um reagente, tricloroacetamida/ $\text{PPh}_3$  (28) (esquema 13).

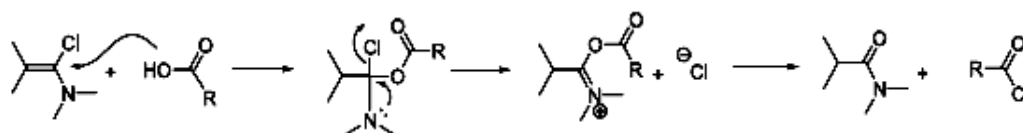


Esquema 8 - Acilação proposta por Skydow.

O autor Warinthorn Chavasiri, estudou vários destes reagentes de acilação, para testar qual o mais reativo, para esse efeito utilizou uma reação competitiva com

tetrabrometo de carbono ( $\text{CBr}_4$ ), apresentando a hexacloroacetona e o tricloroacetoneitrilo como os mais reativos (29).

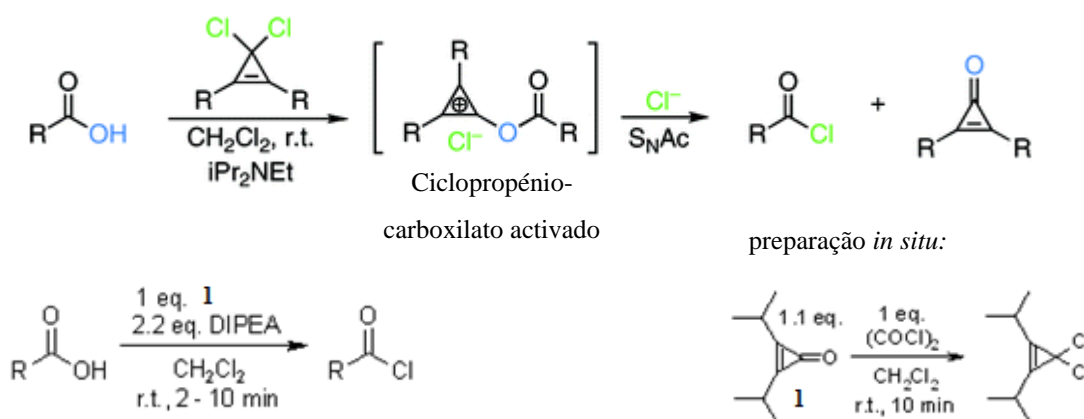
Outras condições neutras são descritas por Ghosez *et al.* usando tetrametil-a-cloroenamina. Durante este processo, a formação de halogenetos de hidrogénio é evitado (30). É um bom método para quando grupos protetores sensíveis a ácidos estão presentes. O esquema 14 representa o seu mecanismo.



Esquema 9- Uso do reagente de Ghosez.

Mais recentemente David J. Hardee *et al.*, (31) desenvolveu um método de ativação de ácidos carboxílicos alifáticos utilizando 3,3-diclorociclopropenos na presença de uma base de amina terciária, DIPEA (di-isopropiletilamina) (esquema 15).

A conversão dos ácidos carboxílicos nos seus cloretos de ácidos correspondentes ocorre rapidamente na presença de uma base amina terciária, reagindo os 3,3-diclorociclopropenos por substituição nucleofílica aromática por ativação do catião. O efeito de substituintes ciclopropeno sobre a taxa de conversão foi examinado. Condições foram desenvolvidas para a preparação de cloretos de ácido de ácidos sensíveis.



Esquema 10 - Método de acilação com 3,3-diclorociclopropeno.

Como podemos observar pelo esquema anterior, temos a formação de um composto intermediário, 3,3-diclorociclopropeno, preparado com cloreto de oxalilo. As condições suaves de reação demonstradas são muito promissoras num ponto de vista processual, no entanto, a preparação do composto intermediário apresenta-se pouco eficiente para se pensar na sua produção em grande escala (rendimento de 18%) (32).

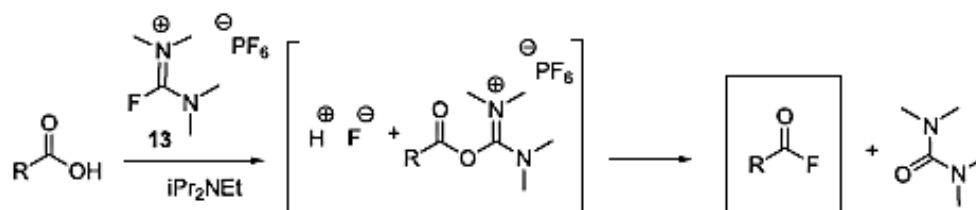
### 1.4.1.2 Fluoreto de acilo

Os cloretos de acilo, devido à sua grande reatividade e labilidade para hidrolisar, têm de ser preparados, do ácido carboxílico respetivo e utilizados de imediato, geralmente necessitando de um excesso para reagir. No entanto, os fluoretos de acilo são mais estáveis à hidrólise mas têm sido menos utilizados para a síntese orgânica devido à suposta menor reatividade para com nucleófilos comuns (33).

Estes são geralmente preparados por troca de halogéneo dos cloretos de acilo correspondentes com uma variedade de reagentes fluorados. Estas reações de troca requerem temperaturas elevadas e as fluorações diretas são inapropriadas para derivados de ácido contendo grupos multifuncionais. O Fluoreto cianúrico é um reagente que proporciona condições suaves, reagindo de modo semelhante ao cloreto cianúrico descrito anteriormente, muito usado para a fluoração de aminoácidos para a síntese de péptidos. Trata-se, no entanto, de um reagente muito caro.

Chinpiao chen *et al.* apresentou um método de síntese económico, conveniente e suave, utilizando para esse efeito o ácido fluorídrico em piridina (70%) e diclorometano à temperatura ambiente (34).

Alternativamente o sal N,N-tetrametilfluoroformamidínio hexafluorofosfato (TFFH) pode ser utilizado na presença de uma base de Hünig, DIPEA (35). Este sal é vantajoso na medida em que não é higroscópico quando manuseado em condições normais. O mecanismo está descrito no esquema 16.

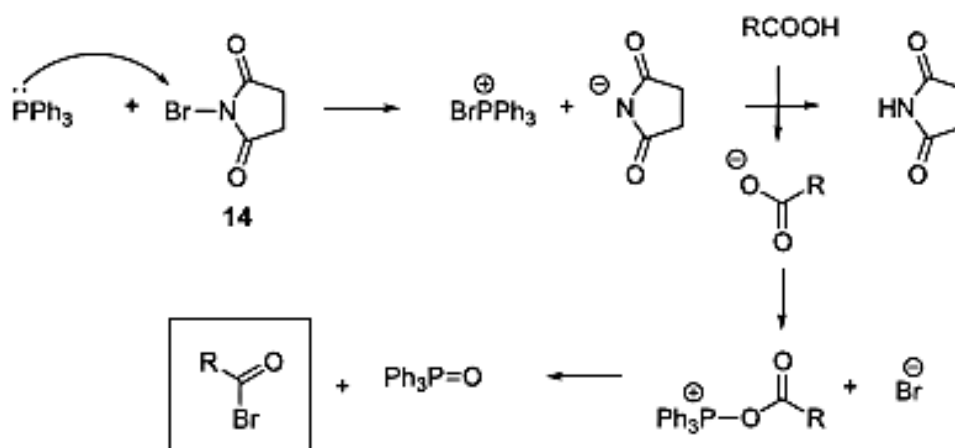


Esquema 11 - Formação do Fluoreto de acilo utilizando TFFH.

A activação do TFFH utiliza a formação de ureia, como força motriz. Reagentes semelhantes são utilizados como reagentes de acoplamento e não requerem o isolamento do cloreto de acilo intermediário (36).

#### 1.4.1.3 Brometo de acilo

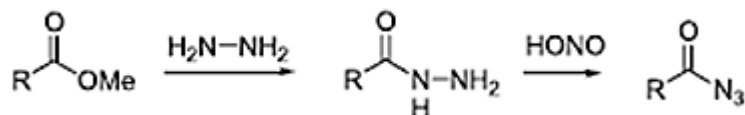
Os brometos de acilo são usados em raras ocasiões para gerar ligações amida. O brometo de  $\alpha$ -bromoacetilo é um dos exemplos mais comuns. Para a preparação de brometos de acilo *in situ*, utiliza-se  $\text{Ph}_3\text{P}/\text{N}$ -bromosuccinimida (NBS), esquema 17 (37).

Esquema 12 - Formação do brometo de acilo com  $\text{PPh}_3$  e NBS.

#### 1.4.2 Azida de acilo

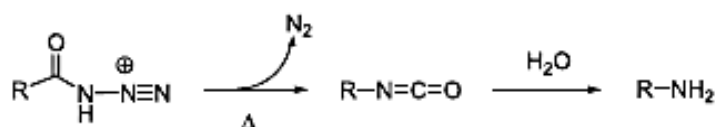
A via por azida de acilo foi das primeiras propostas para o acoplamento e síntese de péptidos por Curtius, (38). As azidas de acilo podem ser preparadas a partir dos

ésteres metílicos correspondentes, através de uma síntese de dois passos. O grupo metóxilo é deslocado com hidrazina para originar a hidrazida de acilo intermediária, seguida de nitração, esquema 18.



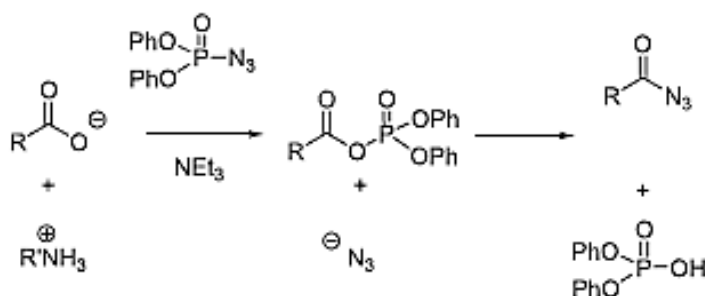
Esquema 13 - Formação da azida de acilo.

Ainda que este seja um método de acoplamento eficaz é possível ocorrer uma reação secundária, denominada por rearranjo de Curtius, onde a azida por efeito de calor sofre um rearranjo, formando um isocianato, esquema 19.



Esquema 14 - Rearranjo de Curtius.

Um método mais conveniente e simples foi desenvolvido utilizando difenilfosfina de azida (DPPA) (39), esquema 20. Se não houver nucleófilo presente a azida pode-se rearranjar no isocianeto, pelo rearranjo de Curtius.



Esquema 15 - Preparação da azida por DPPA.

Hoje em dia a sua produção passa por um modo semelhante ao descrito no fluoreto de acilo através da troca do cloreto pela azida, quando reagindo com azida de sódio, por exemplo (40).

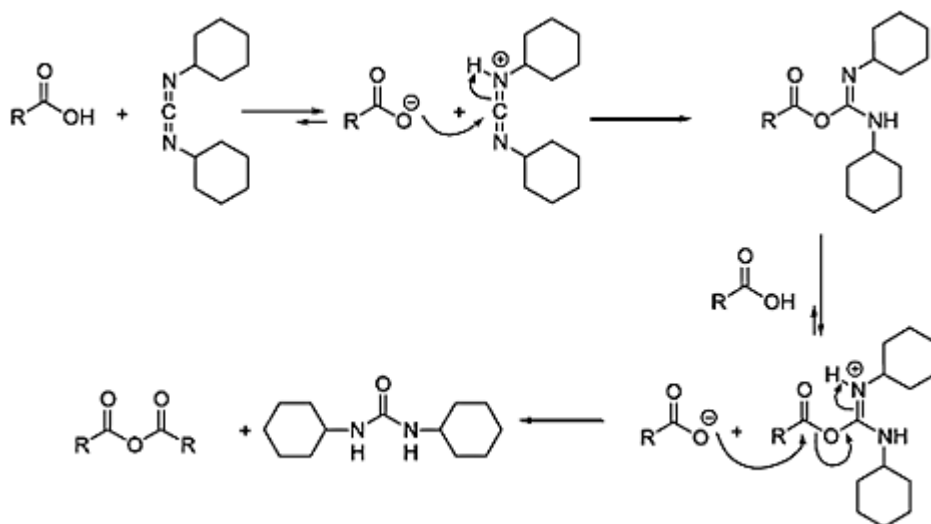
### 1.4.3 Anidridos de ácido

Um anidrido de ácido é um composto orgânico que tem dois grupos acilo ligados ao mesmo átomo de oxigênio. Geralmente, os grupos acilo são derivados do mesmo ácido carboxílico, no entanto, pode ser derivado de outros ácidos orgânicos.

Os anidridos são espécies que reagem prontamente com uma ampla gama de nucleófilos, tais como álcoois, tióis e aminas. Esta estratégia de ativação de ácidos carboxílicos varia desde o uso de anidridos simétricos a anidridos mistos. A diversidade de anidridos comercialmente disponíveis é bastante limitada e muitas vezes, o anidrido desejado tem de ser preparado no momento.

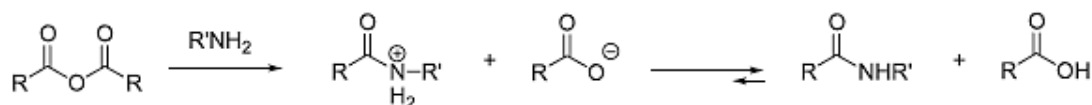
#### 1.4.3.1 Anidridos simétricos

Os anidridos simétricos são formados pelo aquecimento do ácido correspondente ou, em condições mais suaves, por meio de reação com duas moléculas de ácido na presença de um equivalente de diciclo-hexilcarbodiimida (DCC) segundo o mecanismo descrito no esquema 21. A força motriz da reação é a formação de um subproduto de ureia.



Esquema 16 - Preparação do anidrido com DCC

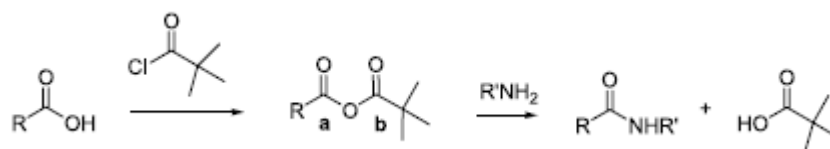
O anidrido reage num segundo passo, com o nucleófilo selecionado, p.e amina. Em teoria, não é requerida qualquer base adicional visto que a adição gera um anião carboxilato *in situ* (41), esquema 22.



Esquema 17 - Acoplamento de uma amina com o anidrido

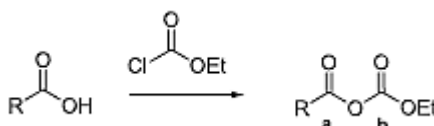
### 1.4.3.2 Anidridos mistos

Para superar este problema de desperdício, os métodos de anidridos mistos foram desenvolvidos, onde a segunda fração carboxílica é barata e fácil de acoplar ao ácido. A dificuldade consiste em conseguir regioseletividade de adição nucleofílica na posição **a** sobre posição **b** (Esquema 23). O anidrido misto piválico é um dos raros exemplos desta série. A seletividade para com a posição **a** acredita-se ser devido ao impedimento estereoquímico do grupo *tert*-Butil (42)



Esquema 18 - Regioseletividade da adição nucleofílica

Outra estratégia é diferenciar a natureza química de ambos os centros reativos. Excelente seletividade é observada com anidridos carbônicos mistos. O centro eletrofílico do carbonato, **a**, é mais reativo que o centro carboxílico **b**, visto que este é menos estabilizado por ressonância. Anidridos de etoxicarbonilo podem ser gerados usando etilcloroformato. (43) (Esquema 24).



Esquema 19- Preparação do anidrido etilcarbônico

### 1.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, ou HPLC do inglês *High Performance Liquid Chromatography*, é uma técnica analítica importante, geralmente utilizada para a estimativa de amostras farmacêuticas e biológicas. Usada para separar misturas de compostos com o propósito de os identificar, quantificar e purificar os componentes individuais dessas misturas.

É a técnica cromatográfica mais versátil, segura, confiável e rápida para o controle de qualidade dos vários componentes dos fármacos. (44)

É um método bastante popular devido à sua sensibilidade, adaptabilidade para determinações quantitativas precisas, facilidade de automação, aptidão para a separação de espécies não-voláteis e/ou termicamente frágeis, e, acima de tudo, a sua aplicabilidade generalizada para as substâncias que são importantes para a indústria e para muitos campos da ciência. Exemplos destes materiais incluem aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, hidrocarbonetos, drogas, terpenóides, pesticidas, antibióticos, esteróides, espécies organometálicas e uma variedade de substâncias inorgânicas.

No início do desenvolvimento da cromatografia líquida, os cientistas perceberam que grandes aumentos na eficiência da coluna poderiam ser conseguidos através da diminuição do tamanho de partícula. Só em meados de 1960 é que foi desenvolvida tecnologia para a produção e utilização de fases estacionárias com diâmetros tão pequenos de 3-10  $\mu\text{m}$ . Esta tecnologia necessitava de instrumentos sofisticados que funcionassem a pressões elevadas. (45)

O HPLC distingue-se da LC (LC do inglês *Liquid Chromatography*), porque este conta com a pressão elevada (~150 bar), de bombas mecânicas enquanto a LC depende da força da gravidade para fornecer pressão. Devido às condições de separação a pressão superior, a HPLC usa colunas com um diâmetro interno relativamente pequeno (p.e 4,6 mm), curtas (p.e, 250 mm) e mais densamente empacotadas com partículas sólidas (p.e sílica, polímeros, ou absorventes) mais pequenas, o que ajuda a atingir separações mais finas do que a LC.

Um instrumento de HPLC, figura 5, inclui geralmente um amostrador pelo qual a amostra é injetada no HPLC, uma ou mais bombas mecânicas para empurrar o líquido através de um sistema de tubagem, uma coluna de separação, um detetor



digital de (p.e UV/Vis, ou um arranjo de foto díodos (PDA-*Photo diode array*)) para a análise qualitativa ou quantitativa de separação e um microprocessador digital para controlar os componentes do *software* e do HPLC (do utilizador).

Alguns modelos de bombas mecânicas podem misturar mais do que um solvente em conjunto e o gradiente entre estes pode modificar as interações químicas que ocorrem na coluna de HPLC e assim, modificar a separação química da mistura.

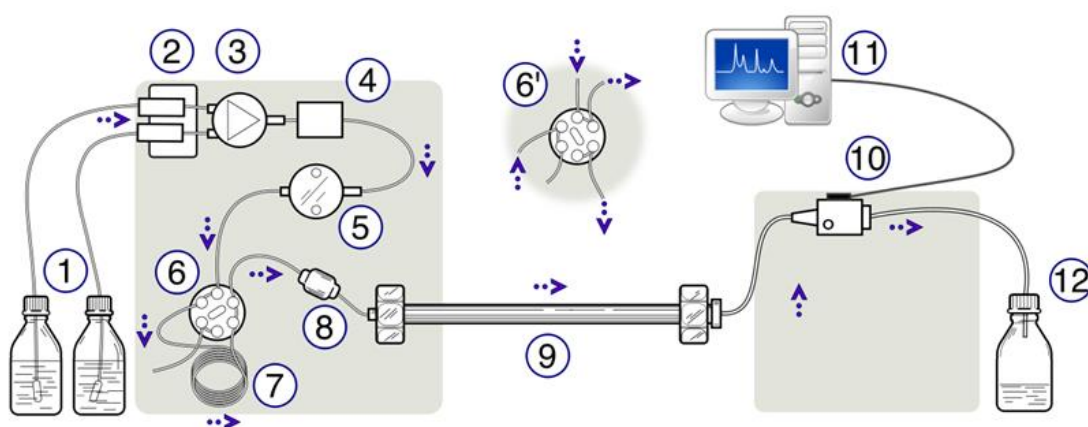


Figura 3- Esquema representativo do funcionamento de um HPLC.

- (1) Reservatórios de solvente, (2) Degaseificador, (3) Válvula de inclinação (4), Recipiente de mistura para a entrega da fase móvel, (5) Bomba de alta pressão (6), válvula de comutação em posição injetar, (6 ' ) comutação da válvula em posição de carga, (7) injetor de amostra, (8) pré-coluna, (9), coluna analítica (10), Detetor, (11) aquisição de dados (12), coletor de resíduos ou fração.

A separação por HPLC é influenciada pelo eluente- fase móvel, as interações químicas deste com o analito e interações químicas entre a mistura da amostra e as partículas sólidas no interior da coluna.

As fases móveis mais utilizadas incluem combinações de água com vários solventes orgânicos miscíveis. Algumas técnicas de HPLC utilizam fases móveis não aquosas. A composição da fase móvel pode ser mantida constante, eluição isocrática, ou variável, eluição em gradiente, durante a análise cromatográfica. A eluição isocrática é normalmente eficaz na separação de componentes da amostra que não são muito diferentes na sua afinidade para com a fase estacionária.

Alguns tipos de HPLC dependem da fase estacionária do sistema utilizado no processo.

### 1.5.1 Cromatografia de fase normal

O HPLC de fase normal (NP-HPLC- *Normal Phase*) também conhecido por cromatografia de adsorção, separa os analitos com base na sua afinidade para a fase estacionária polar, p.e sílica, pelo que é baseada na capacidade do analito para se envolver em interações polares (hidrogénio -ligação de tipo dipolo-dipolo) com a superfície do adsorvente. NP-HPLC utiliza uma fase móvel apolar, orgânica, e funciona de forma eficaz para a separação de analitos prontamente solúveis em solventes apolares. As forças de adsorção aumentam com o aumento da polaridade do analito. As forças de interação dependem não só dos grupos funcionais presentes na estrutura da molécula do analito, mas também em fatores estéreos. O efeito causado pelo impedimento estereoquímico na força de interação permite que este método separe isómeros estruturais.

A utilização de solventes mais polares na fase móvel irá diminuir o tempo de retenção dos analitos, enquanto solventes mais hidrofóbicos tendem a induzir uma eluição mais lenta. Solventes muito polares, até mesmo vestígios de água na fase móvel tendem a adsorver à superfície da fase estacionária formando uma camada que é considerada ter um papel ativo na retenção. Este comportamento é bastante peculiar para cromatografia de fase normal, porque é quase exclusivamente regida por um mecanismo de adsorção, isto é, analitos interagem com uma superfície sólida, em vez de com a camada solvatada de um ligando ligado à superfície da fase estacionária.

NP-HPLC deixou de ser utilizada com o desenvolvimento de HPLC de fase reversa, por causa da sua fraca reprodutibilidade dos tempos de retenção, devido à presença de uma camada de água ou um solvente orgânico prótico sobre a superfície da sílica ou alumina. Esta camada muda com quaisquer alterações na composição da fase móvel (p.e, nível de humidade), causando tempos de retenção distintos.

### 1.5.2 Cromatografia de fase reversa

O HPLC de fase reversa (RP-HPLC- *Reverse Phase*) tem uma fase estacionária apolar e utiliza uma fase móvel aquosa, moderadamente polar. A fase estacionária mais comumente utilizada é uma sílica modificada à superfície com  $\text{RMe}_2\text{SiCl}$ , onde R é um grupo alquila de cadeia linear tal como  $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$  ou  $\text{C}_8\text{H}_{17}$ .

O mecanismo de separação em cromatografia de fase inversa depende da interação de ligação entre o analito hidrófobo na fase móvel e o ligando imobilizado hidrofóbico, isto é, a fase estacionária. A natureza da interação da ligação hidrofóbica é, por si só, um assunto de debate (46) mas a sabedoria convencional assume que a interação de ligação é o resultado de um efeito de entropia favorável. Em cromatografia de fase reversa as fases móveis são essencialmente aquosas, o que indica a presença de moléculas de água organizadas em torno, tanto do analito como da fase estacionária - solvatação. Quando o analito se liga à fase estacionária hidrofóbica, a área hidrofóbica exposta ao solvente é minimizada, logo o grau de solvatação é diminuído com um aumento correspondente favorável na entropia do sistema. Desta forma, é vantajoso do ponto de vista energético para as porções hidrofóbicas, isto é, do analito e do ligando se associarem.

Cromatografia de fase reversa é um processo de adsorção, que se baseia num mecanismo de partição para efetuar a separação. O analito distribui-se no equilíbrio estabelecido entre a fase móvel e a fase estacionária. A distribuição do analito entre as duas fases depende das propriedades de ligação do meio, a hidrofobicidade do analito e a composição da fase móvel. Inicialmente, as condições experimentais destinam-se a favorecer a adsorção de soluto a partir da fase móvel para a fase estacionária. Subsequentemente, a composição da fase móvel é modificada para favorecer a deadsorção do analito a partir da fase estacionária de volta para a fase móvel, figura 6. As separações dependerão da adsorção/deadsorção reversível do analito, de diferentes graus de hidrofobicidade, e fase estacionária hidrófoba.

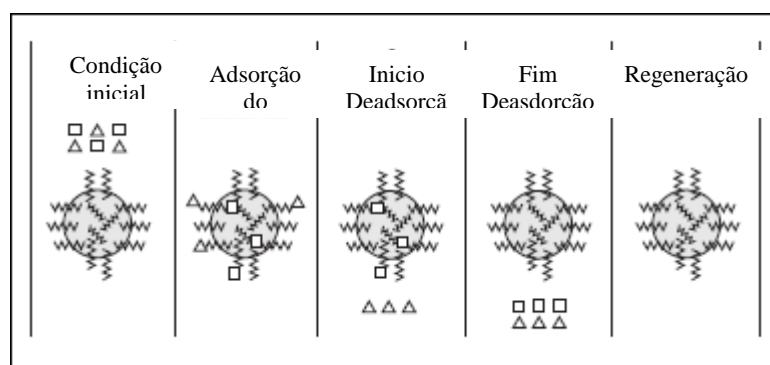


Figura 4 - Princípio de cromatografia de fase reversa com gradiente de eluição.

Esta técnica utiliza geralmente um gradiente de eluição em vez de uma eluição isocrática. Enquanto o analito adsorve fortemente à superfície de uma matriz de fase reversa em meio aquoso, estes desadsorvem da matriz numa gama muito estreita de concentração do modificador orgânico.

A técnica RP-HPLC permite grande flexibilidade em condições de separação de modo a que o investigador possa escolher ligar o analito de interesse, permitindo que os contaminantes passem através da coluna ou para ligar os contaminantes, permitindo que o analito desejado passe livremente. Geralmente, é mais apropriado ligar o analito de interesse porque ao desadsorver, elui num estado mais concentrado. Além disso, uma vez que a ligação sob as condições iniciais da fase móvel é completa, a concentração de analito na solução da amostra não é crítica, permitindo amostras diluídas de serem aplicadas à coluna.

### 1.5.3 Cloretos de ácido em HPLC

O HPLC é um método de escolha para a determinação de substâncias orgânicas e inorgânicas em matrizes diferentes.

Infelizmente, muitas substâncias de interesse podem não ser detetadas em HPLC, no entanto, este problema pode ser superado através da indução de reações de derivatização.

A derivatização é muitas vezes necessária para alterar as características de retenção, aumentar a resposta do analito às várias técnicas de detecção e/ou promover uma resposta seletiva para analitos em matrizes complexas. A reação de derivatização pode ser realizada tanto de pré- ou pós-coluna.

No modo de pré-coluna, a reação é geralmente realizada manualmente em frascos de HPLC-*vials* antes da sua injeção. Deste modo permite condições de trabalho mais flexíveis (tempo de reação, solvente de reação, eliminação do excesso de reagente). Esta técnica é frequentemente usada para promover uma resposta cromatográfica melhorada do analito em estudo.

A derivatização pós-coluna é realizada através da introdução de um reagente derivatizante entre a coluna e o detetor. Esta metodologia melhora a sensibilidade e seletividade em análises de HPLC. É desejável que a reação de derivatização seja compatível com fase móvel para evitar a formação de precipitados que bloqueiem os

poros da coluna (47). Executar a derivatização pós-coluna requer equipamentos mais pesados, o sistema de HPLC deve ser modificado com a adição de um sistema de fornecimento de fluido secundário.

A mistura passa através de um reator para permitir que haja tempo suficiente para que a reação se dê completamente. O reator pode ser aquecido, se necessário, com o intuito de acelerar a reação.

Para esta técnica é essencial que:

- A solução reagente seja miscível com o efluente da coluna;
- O reagente seja estável;
- A mistura de reagente com efluente seja rápida;
- A mistura seja eficiente para evitar a geração de ruído;
- As taxas de fluxo de reagentes e efluentes sejam iguais;
- O sinal de fundo seja mínimo;
- A reação seja suficientemente rápida para minimizar a perda de resolução;
- A reação seja completa;
- Haja Reprodutibilidade para máxima sensibilidade.

Os cloretos de ácido são usados como reagentes derivatizantes e representam uma vasta gama (48).

Estes são fáceis de se obter e reagem com vários grupos funcionais, como os descritos anteriormente em 1.3. São muito reativos, resultando em reações muito exotérmicas, reagindo completamente. Estes são utilizados para introduzir num analito em estudo de baixa resposta aos vários tipos de detecção, grupos cromóforos, fluoróforos de modo a melhorar as suas características cromatográficas.

No entanto um cloreto de ácido, devido à sua reatividade, não pode ser analisado por si só, podendo sofrer hidrólise com águas vestigiais presentes no eluente ou com material presente na coluna, p.e grupos silanol, reagindo até com os componentes do HPLC, p.e agulha do injetor, coluna (fase estacionária), tendo por isso de ser também derivatizado.

Existem porém algumas fases estacionárias que são suficientemente inertes para poderem ser utilizadas. No entanto, apresentam uma alternativa limitada pelo facto

de ser necessário que o HPLC esteja equipado com um injetor e agulha da seringa muito inertes (p.e platina) devido à labilidade dos cloretos de acilo.

## 1.6 Espectroscopia de infravermelho

A espectroscopia de infravermelho é a espectroscopia de que trata a região infravermelha do espectro eletromagnético.

A espectroscopia de infravermelho explora o facto de que as moléculas absorvem as frequências específicas, que são características da sua estrutura. Estas absorções são frequências de ressonância, ou seja, a frequência da radiação absorvida corresponde à energia de transição do vínculo ou grupo que vibra. As energias são determinadas pela configuração das superfícies moleculares potenciais de energia, as massas dos átomos e o acoplamento vibrónico associado.

Cada estado vibracional excitado é alcançado quando uma molécula é exposta a uma frequência específica. Determinar essas frequências e representá-las permite-nos determinar os vínculos que existem numa molécula. Estas frequências estão todas dentro da região do infravermelho da região eletromagnética, uma região de menor comprimento de onda que a luz visível.

Tal como acontece com todas as técnicas espectroscópicas, pode ser utilizada para estudar e identificar os produtos químicos. É uma técnica espectroscópica rápida, relativamente barata para a determinação do grupo funcional e elucidação da estrutura. Não irá fornecer informação suficiente para determinar uma estrutura completa, contudo vai dizer quais os grupos funcionais que estão presentes, porque a energia que corresponde a valores específicos permite a identificação de diversos grupos funcionais dentro de uma molécula. Um espectro de IV geralmente estende-se desde a radiação com comprimento de onda entre  $4000\text{ cm}^{-1}$  e  $600\text{ cm}^{-1}$  e pode ser dividida em região de grupo funcional e região de *fingerprint*. A região de *fingerprint* é diferente para cada molécula. Duas moléculas diferentes podem ter regiões de grupos funcionais semelhantes, mas terá sempre uma região de *fingerprint* diferente.

Não se aprofundou demasiado esta técnica, no decorrer do trabalho realizado tendo sido utilizada meramente com o propósito de verificar a presença de bandas indicando assim o sucesso da reação pretendida.

## Capítulo 2 | APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

### 2.1 Preparação da matéria-prima para o reagente auxiliar

#### 2.1.1 Adaptações ao método actual

O objetivo principal deste trabalho centrou-se na produção do reagente auxiliar envolvido no fabrico do princípio ativo, API\_1, bem como a sua matéria-prima. Como mencionado anteriormente na introdução, o progresso deste projeto viu-se gravemente afetado devido a encomendas de má qualidade do Matéria-prima\_1, por parte dos fornecedores chineses. Deste modo, foram procuradas outras alternativas para a sua produção.

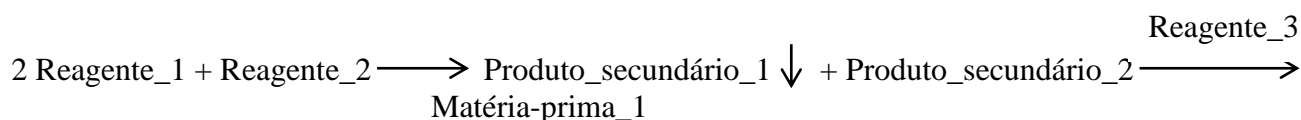
No laboratório de desenvolvimento de novos produtos (LDNP) do centro de I&D da Cipan, começaram por adaptar um procedimento descrito na literatura (49), que visa a produção da matéria-prima necessária para a produção do reagente auxiliar em questão, sendo para tal necessário encomendar um reagente alternativo, Reagente\_2, que por sinal é mais barato.

Depois de encontrada a melhor adaptação do método, foi possível obter um procedimento reprodutível e com bons resultados, descrito neste trabalho no ponto 6.2.1.1.

Numa primeira observação do método reparou-se que este não sofreu alterações quanto às proporções dos reagentes, onde é utilizado um excesso de 5,3 equivalentes de Reagente\_1 relativo ao Reagente\_2. Deste modo, decidiu-se investigar se a reação era possível, e caso fosse, como procederia utilizando para este efeito menores quantidades dos reagentes, numa tentativa de economizar os mesmos.

Num primeiro ensaio tentou-se usar o mínimo de equivalentes possíveis tendo em conta a estequiometria da reação (2:1), esquema 25, tabela 1. O volume de todos os reagentes intervenientes neste processo, foram calculados mediante o valor atual de Reagente\_1.





Esquema 20 - Esquema reacional da preparação do Matéria-prima\_1.

Tabela 1- Condições experimentais.

Ensaio	Equivalentes Reagente_1: Reagente_2	Solvente	Produto secundário (g)	Produto pretendido (g)	Rendimento Molar (%)
1	Confidencial	Solvente_1	184,22	92,14	54
2			230,59	89,45	53
3			231,64	118,17	70
4			250,15	91,59	54
5		Solvente_1 recuperado	80,30	75,12	44
6			--	--	--

Nestas condições, a reação decorreu de modo diferente do esperado, não tendo entrado em refluxo, no entanto, deu-se a precipitação do produto secundário, o Produto\_secundário\_1, como era expectável. O volume da mistura reacional, mostrou-se deficiente para a quantidade de produto que precipitou, formando uma maior tensão superficial impedindo o refluxo. Depois de este ser filtrado, as águas-mães foram recolhidas e foi-lhe adicionado lentamente, sob agitação, o ácido clorídrico. É observado de imediato a precipitação de um produto, no entanto, era esperado que no fim da adição, este começasse por dissolver o que não se verificou. Assim, adicionou-se uma nova alíquota de ácido clorídrico, até que tudo ficasse dissolvido.

Efetuuou-se um ensaio utilizando o método *standard*, ensaio 4, e obteve-se um rendimento menor. Cada passo processual deste método é importante, e um maior controlo da temperatura e dos tempos reacionais, mostrou ser essencial, o LDNP já conseguiu obter rendimentos molares de cerca de 88%.

Este ajuste ao método provou ser reprodutível com um rendimento variável, 54-75%, ligeiramente inferior ao obtido pelo método *standard*.

Destes ensaios, utilizou-se uma amostra para traçar os espectros de infravermelho onde se verificou que em ambos os ensaios se obteve o mesmo produto (anexo A.1), ainda que o aparelho seja antigo e a sua resolução não seja

elevada, foi possível observar a banda do grupo carbonilo a, aproximadamente,  $1754\text{ cm}^{-1}$  assim como uma banda larga do hidroxilo a  $3000\text{ cm}^{-1}$ , tendo em conta que a transmitância se apresenta muito baixa.

Tendo em conta os resultados obtidos, a economização dos reagentes torna-se uma possibilidade.

Outra ideia para a economização destes reagentes partiu do pressuposto, se seria possível a sua reutilização. Uma vez que a Reagente\_1, é muito volátil, acabando por se perder quando a mistura é concentrada no rotavapor e o Reagente\_2 é transformado, com a mesma, na matéria-prima\_1, o solvente\_1 é a única hipótese viável de ser recuperado.

Deste modo, foram repetidos os ensaios que apresentaram melhores resultados, desta vez utilizando o solvente\_1 exausto, recuperado pelo kilolab numa preparação igual desta matéria-prima mas em maior quantidade.

A utilização deste solvente\_1 não trouxe qualquer melhoria ao procedimento. Na adição inicial do Reagente\_2 à mistura de Reagente\_1 com solvente\_1 não se verificou formação de qualquer precipitado, no entanto, quando a solução foi arrefecida a uma determinada temperatura esta começou a congelar, o que demonstra a presença, mesmo que vestigial, de água, tendo em conta que todos os reagentes intervenientes têm pontos de fusão muito abaixo da temperatura ao qual foi arrefecida.

No ensaio 5, foi ainda possível filtrar um precipitado depois de a solução ter ficado durante a noite no frigorífico. Como era de esperar o rendimento foi bastante afetado. De modo a averiguar se o precipitado recolhido era o produto pretendido, analisou-se por espectroscopia de infravermelho, anexo 4, onde se pode verificar que se tratava de um composto semelhante, apresentando todas as bandas anteriormente descritas, foram observados dois picos não identificados na zona dos  $2000\text{ cm}^{-1}$ .

Já no ensaio 6, não houve qualquer precipitação. Seguiu-se com a reação e obteve-se no final um precipitado. Efetuando os cálculos para saber o rendimento molar, verificou-se que ultrapassou os 100%, confirmando como era de esperar, que ambos os produtos precipitaram juntos.

Ainda que os resultados destes últimos ensaios não sejam animadores, serviram para confirmar que o solvente\_1 é essencial para a precipitação do Produto\_secundário\_1.

No entanto, ao repetir estes ensaios, desta vez, com solvente\_1 destilado, foi possível reproduzir de novo o método com rendimentos idênticos.

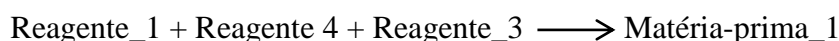
Ficando assim registado que é possível a reutilização do solvente\_1, mas apenas depois de este ser devidamente destilado, permitindo à Cipan uma maior rentabilidade e proveito das suas matérias-primas.

### 2.1.2 Métodos Alternativos

#### 2.1.2.1 Monocarboximetilação de aminas primárias

Quando nos deparámos com a falta de reagentes para a síntese desta matéria-prima tornou-se essencial procurar novos métodos para a sua produção, o que se mostrou difícil dado à escassa literatura para este tipo de composto. Ainda assim, foi possível encontrar artigos que mencionavam sínteses para a produção do mesmo composto ou semelhantes, (50) (51) (52) que iam de encontro aos reagentes ainda disponíveis no LDNP, um deles até oferecendo um método analítico da matéria-prima, ainda que tenha sido executado sem êxito.

Os métodos aplicados na literatura encontrada, apresentavam-se de fácil execução, ainda que com tempos de reação muito longos. Estes consistiam na monocarboximetilação de aminas primárias, isto é, reação entre reagente\_4, 2 equivalentes, com uma amina primária levando a cabo a formação do derivado *N*-(carboximetil)-*N*-formilo da amina sendo depois hidrolisado, esquema 26.



Esquema 21 - Esquema reacional da monocarboximetilação de aminas primárias.

Num primeiro ensaio, (ensaio 6 da tabela 2) e como indicado pelo autor Kihlberg (50), utilizou-se solvente\_2, uma vez que a utilização de ácidos carboxílicos como solventes proporciona condições reacionais suaves. Seguindo

o procedimento descrito pelo autor, a Reagente\_1 é adicionado ao solvente\_2 que vai protonar a amina, fazendo com que esta perca força nucleofílica para atacar o grupo carbonilo do reagente\_4, ainda assim continuou-se como indicado. A adição da amina causou uma grande libertação de gases. Após a libertação, adicionou-se o reagente\_3. Depois da reação de hidrólise e evaporação do solvente, tentou-se fazer precipitar o composto como indicado, foi-lhe adicionado o mínimo de etanol para solubilizar o resíduo resultante e juntou-se éter dietílico frio, no entanto, não se observou qualquer precipitado, ficando uma solução negra.

Experimentou-se adicionar a amina depois do reagente\_4 mas terminou com o mesmo resultado.

Decidiu-se então experimentar outros solventes como descrito por Gibbs (51), onde demonstrava melhores resultados utilizando solvente\_3, ainda que as condições reacionais divergissem do método de Kihlberg.

Seguindo o método deste autor, adicionou-se a amina a uma solução do reagente\_4 em solvente\_3, ficando sob agitação durante 24 horas, no entanto não se observou a formação de qualquer precipitado como era indicado. No passo de hidrólise onde era suposto ficar a refluxo *overnight*, verificou-se que a temperatura da manta de aquecimento desceu tendo a solução ficado sob aquecimento mas não a refluxo, pelo que fora deixado então por mais 12 horas a refluxo, para assegurar a hidrólise.

Depois de evaporados os solventes, procedeu-se de igual modo para a precipitação do produto, desta vez com metanol e éter dietílico, obtendo-se um precipitado acizentado. Os cálculos foram feitos assumindo ser o composto pretendido, este método provou ter rendimentos molares semelhantes ao método *standard*, rondando os 78%. Foi feita uma caracterização por infravermelho, anexo 5, onde se verificou que o produto obtido não era o pretendido. Este apresentava bandas mais bem definidas e diferenciadas, com a presença da banda do carbonilo e novamente a presença de dois picos na zona dos 2000 cm<sup>-1</sup> semelhante ao obtido pelo método anterior no qual se utilizou o solvente\_1 recuperado, possibilitando a hipótese da reação não ter sido completa.

Num terceiro ensaio utilizou-se o solvente\_4 como solvente. Adicionou-se o reagente\_4, 2,4 equivalentes, à mistura do solvente com a Reagente\_1, este não se dissolveu, formando mesmo uma goma, deixou-se sob agitação *overnight* para ver se se dissolvia, mas tal não se observou. Foi adicionada uma nova alíquota da amina, de modo a igualar as proporções entre os reagentes, acabando também por ajudar a solubilizar a goma formada, ficando agora uma suspensão. A hidrólise seguiu como programado, observando-se a mudança de cor da solução.

O resíduo após evaporação dos solventes foi novamente precipitado com éter dietílico frio.

Os cálculos foram feitos de igual modo, obtendo-se um rendimento molar de 50%. Foi também realizada uma caracterização por infravermelhos a este precipitado e concluiu-se que o composto se apresentava igual ao anteriormente descrito.

Estes procedimentos, apresentavam teoricamente uma possível alternativa ao método atual, no entanto, os grandes períodos de refluxo, obrigando a ter aparelhos ligados durante a noite e secar solventes como água, são aspetos que os tornam pouco apetecíveis a longo prazo.

**Tabela 2 - Condições experimentais para a monocarboximetilação de aminas primárias.**

<b>Ensaio</b>	<b>Equivalentes C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>H<sub>4</sub>:C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>N</b>	<b>Solvente</b>	<b>Temp (°C)</b>	<b>t (h)</b>	<b>Método de hidrólise</b>	<b>Hidrólise t(h)</b>	<b>Rendimento Molar</b>
<b>7</b>	Confidencial	Solvente_2	70	14	Reagente_3	5	--
<b>8</b>		Solvente_4	r.t	12	1M	24	50
<b>9</b>		Solvente_3	r.t	24	Reagente_3 2M	12	78

### **2.1.2.2 Matéria-prima\_2**

Entre toda a literatura, no que se referia à ligação amida, que é a desejada para a produção da API\_1, notou-se em todos eles apenas a menção do ácido carboxílico. Com o método atual, tem-se um cloridrato do ácido carboxílico. Procurou-se então saber se este cloridrato teria influência no processo de fabrico do API.

Através do trabalho de Messenguer (53), foi encontrada uma via processual, cujo intermediário apresentava uma estrutura idêntica ao composto desejado, utilizando para tal uma segunda amina, Reagente\_5. Esta deve funcionar como catalisador, capturando um próton do Reagente\_1, tornando-a mais electrofílica favorecendo o ataque ao carbonilo do Reagente\_2.

Ao aplicar este novo procedimento, depois do extensivo *work-up* indicado em 6.2.1.5, obteve-se um líquido âmbar viscoso (60%), contrariamente ao precipitado que se obtém quando na forma de cloridrato. Este provou dificultar o seu manuseamento assim como o seguimento desta matéria-prima para a obtenção do reagente auxiliar.

Numa melhor observação do mecanismo de reação deste procedimento, reparou-se que havia um intermediário igual ao método *standard*. Foi então que surgiu a ideia de adaptar ambos os métodos.

Efetuuou-se o procedimento de igual modo, no entanto ao invés de utilizar o reagente\_6, utilizou-se o reagente\_3, para a produção do cloridrato, aplicando também as concentrações e lavagem com isopropanol e arrefecimento do método *standard*.

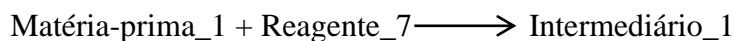
Num primeiro ensaio onde se efetuou esta adaptação, foi possível obter um precipitado idêntico ao procedimento atual e verificou-se pelo infravermelho que se tratava de facto do mesmo, mas com um rendimento molar de apenas 12,5%. Tentou-se então reproduzir o método, mas a cada tentativa verificaram-se comportamentos diferentes. Numa das tentativas utilizou-se um lote diferente de reagente\_5 que apresentava uma cor mais amarela e logo após a sua adição à solução do tetrahidrofurano com o Reagente\_1, começou a aparecer um precipitado. Só se verificou formação de precipitado quando depois do *work-up* a solução foi levada à secura. Ainda assim, o precipitado, após caracterização por infravermelhos, mostrou que não se tratava do produto pretendido.

Esta via foi então descontinuada por não se mostrar reprodutível.

### **2.2 Produção do reagente auxiliar**

Depois de obtida a matéria-prima, começou-se por verificar como é que no LDNP se produzia o reagente auxiliar, o intermediário\_1.

O método utilizado para a produção deste reagente é bastante simples, descrito em 6.2.2.1, no entanto, o reagente\_7 requer um manuseamento cuidadoso e sempre na *hotte* e utilização de uma *trap* de lavagem de gases, isto porque a reação promove a libertação de gases perigosos, esquema 27.



**Esquema 22 - Mecanismo da reação da produção do intermediário\_1 partindo do matéria-prima\_1.**

Dado o refluxo por terminado, deixa-se arrefecer a solução e com cuidado, retira-se o tubo da *trap*, ao arrefecer cria-se um vácuo fazendo sugar a água da *trap* podendo mesmo cair na reação, o que não deve ocorrer, pois o intermediário\_1 formado e o reagente\_7 reagem violentamente com a água.

Utilizaram-se amostras das várias matérias-primas sintetizadas anteriormente para ver se as condições com que foram produzidas teriam influência no produto obtido, após reação com o reagente\_7.

Como indicado na introdução, este composto é muito reativo para ser analisado diretamente por HPLC e a sua análise só é possível derivatizando-o para um grupo mais estável, p.e um grupo amida, que é precisamente o grupo presente na API\_1.

Tendo em conta que a Cipan possui o *know-how* para a análise deste último, desenvolveu-se um método para saber ao certo se o reagente auxiliar estaria apto para futura utilização para a produção do mesmo. Este consiste na análise por HPLC de uma amostra da reação entre o intermediário\_1 e composto\_1, da qual se confirma a presença do API, a um tempo de retenção de 8,6 minutos, assim como a quantidade do composto\_1, tempo de retenção de 7,5 minutos, por reagir. A este teste designa-se Teste de desempenho, descrito mais a frente no ponto 6.2.5. Depois de largamente utilizado este ensaio e testada a sua reprodutibilidade, foi pressuposto pela equipa da Cipan que o reagente auxiliar estaria apto para futura utilização quando o resultado da análise da amostra deste teste apresentasse uma quantidade de composto\_1 menor que 3%.

Das matérias-primas utilizadas, todas mostraram conversão no API pretendido com valores 88%, no entanto, verificou-se que a matéria-prima onde se utilizou 2 e 3 equivalentes de Reagente\_1, ensaio 1 e 2 respetivamente, (tabela 3) não foram

aprovados, apresentando presença do intermediário de 5 e 6 %, respetivamente (dados retirados dos cromatogramas em anexo A9 em diante).

Por sua vez, o ensaio onde se usou um certo número de equivalentes, (ensaio 3) foi aprovado, mostrando mais uma vez a possibilidade de utilização deste procedimento. Retirou-se uma amostra para infravermelho, anexo 6, onde se verificou as bandas do carbonilo,  $1755\text{ cm}^{-1}$ , assim como do haleto,  $1815\text{ cm}^{-1}$ , com a mesma intensidade. Este facto deve-se não à reação incompleta, mas sim à reatividade do intermediário\_1 com a humidade presente do brometo de potássio, substância altamente higroscópica, usada para as pastilhas do espectrofotómetro.

Como era de esperar, o ensaio no qual foi utilizado o solvente\_1 recuperado não apresentou qualquer conversão significativa (ensaio 6).

O matéria-prima\_1 feito com o reagente\_4 (ensaio 7) também não foi aprovado, fez-se um infravermelho do precipitado recolhido onde se verificou a perda da banda do carbonilo (anexo 7).

O ensaio partindo da matéria-prima\_2, cuja identificação por infravermelho foi inconclusiva, após a reação com o cloreto de tionilo, manteve-se viscoso, ficando depois agarrado ao funil, tendo sido impossível o seu isolamento e futuro teste de desempenho.

Tendo em conta os dados recolhidos da literatura, pouco se podia fazer para melhorar este método.

Contudo, e como indicado na introdução, a aplicação de reagente\_8, como catalisador, não só apresentava condições de reação mais suaves como tempos de reação menores, o que poderia ser uma mais-valia.

Fizeram-se vários ensaios aplicando esta metodologia, tendo em conta a variada literatura, no qual se utilizou uma quantidade catalítica à temperatura ambiente (ensaio 4), não só não se verificou a formação de gases, indicativo de que a reação está a proceder, como a solução não mudou de cor, que é costume observar-se. Fez-se o teste de desempenho com o precipitado recolhido, mas não foi aprovado, no qual se concluiu que a reação não teve êxito. Decidiu-se então fazer um novo ensaio, desta vez com um maior número de equivalentes e a refluxo do solvente, ensaio 5, terminando de igual modo com um mau desempenho.



Do mesmo modo, como para a matéria-prima inicial, decidiu-se experimentar se era possível a utilização de cloreto de tionilo exausto, isto é, utilizado previamente noutra produção do mesmo composto.

O resultado deste ensaio, ensaio 8, foi animador pois o produto obtido apresentou grande conversão no API, apenas com 1,7% do intermediário por converter.

O mesmo resultado pode ser obtido destilando o cloreto de tionilo, no entanto, é desaconselhado devido ao cheiro intenso que se liberta.

**Tabela 3- Condições reacionais para a preparação do reagente auxiliar.**

Ensaio	Lote	Reagente_7 (eq.)	Solvente	Catalisador (eq.)	Temp (°C)	t (h)	Rendimento Molar	Teste de desempenho
1	1		Confidencial		70-80	4	59	N.a
2	2				70-80	4	67	N.a
3	3				70-80	4	72	Aprovado
4	3				r.t	0,5	87	N.a
5	3				45	4	87	N.a
6	5				70-80	4	46	N.a
7	8				70-80	4	44	N.a
8	3				70-80	4	67	Aprovado

### 2.2.1 Ensaios de estabilidade

Tendo em conta a instabilidade deste material procurou-se saber quanto tempo podia ficar armazenado e em que tipo embalagem seria melhor para o seu armazenamento. Deste modo sintetizou-se o reagente auxiliar, em grande quantidade para poder separá-lo em vários lotes, e armazená-los em condições diferentes. As condições seleccionadas foram de encontro às possibilidades do complexo da Cipan.

Num primeiro ensaio, produziu-se um lote de intermediário\_1, que após sair da estufa, foi submetido ao teste de desempenho e colocado num saco de plástico, como é habitual. Depois de verificado o seu desempenho, este foi separado em 5 lotes, 10 g cada. Num foi apenas dado um nó ao saco de plástico, os restantes receberam um novo selo sobre o de fabrico. Depois de devidamente separados, foram selados sob vácuo e colocados dentro de um novo saco, plástico e/ou alumínio, e selado sob vácuo novamente. Um dos que foi selado em dois sacos plásticos foi depois colocado

dentro de um pote plástico, deixado por último à temperatura ambiente e o outro foi guardado na câmara frigorífica. Nas amostras seladas em sacos de alumínio foi colocada uma saqueta de sílica. Foram então guardadas uma na câmara frigorífica e outra no armário de reagentes à temperatura ambiente. Estas ficaram armazenadas por 20 dias. No fim deste período foi refeito o teste de desempenho.

Como se pode observar na tabela 4, ao fim dos 20 dias verificou-se em todos os lotes uma degradação evidente do cloreto de ácido, ainda que apenas tenham falhado o teste por 3 pontos percentuais. Do mesmo modo, em todos há uma grande conversão no API obtendo-se purezas cromatográficas de 90%.

Achava-se inicialmente que os sacos plásticos fossem permeáveis à humidade, mas olhando de novo para os resultados verificou-se que não havia grandes diferenças entre o uso dos sacos plásticos e de alumínio.

Do mesmo modo, pensava-se que quando armazenados a frio, iria diminuir a sua reatividade e manter a sua estabilidade, no entanto esta revelou degradar mais, quando comparado ao ensaio que ficou à temperatura ambiente (anexos A16 a A21).

**Tabela 4 - Condições e resultado do primeiro teste de estabilidade.**

	<b>Lt inicial</b>	<b>Nó simples</b>	<b>Duplo + pote</b>	<b>Duplo + frio</b>	<b>Alumínio</b>	<b>Alumínio + frio</b>
Convertido (%)	95,06	89,43	91,1	89,88	91,69	91,52
Por converter (%)	0,93	6,18	3,9	5,97	4,15	4,52

Sabe-se também que amostras mais pequenas estão sujeitas a variações maiores. Deste modo voltou-se a fazer um novo lote de intermediário\_1 e efetuou-se um novo ensaio utilizando, desta vez, 20 g em cada lote. Estes foram novamente separados como descrito anteriormente, tendo-se feito um novo ensaio onde se colocou dentro de um saco de alumínio sem sílica para ver se teria alguma influência no armazenamento deste produto.

Ao efetuar o teste de desempenho deste novo lote inicial, verificou-se, ao arrefecer a solução para a adição do cloreto de ácido, que arrefeceu demasiado causando a precipitação do composto\_1 e ao deixar-se aquecer a reação decorreu normalmente ficando tudo dissolvido. A amostra recolhida indicou que este não teria

um bom desempenho, tendo ficado acima do limite proposto. Ainda assim, seguiu-se com a separação nos vários lotes e armazenamento dos mesmos por 11 dias, tabela 5.

Como se pode observar pelos resultados, ainda que o desempenho do lote inicial tenha sido afetado com o arrefecimento brusco, todos os restantes foram aprovados, embora alguns com desempenhos muito próximos do valor que levaria à sua reprovação.

Também foi possível observar que a utilização da sílica dentro dos sacos de alumínio de pouco serviu, visto apresentarem valores muito próximos.

Para verificar a reprodutibilidade dos resultados do primeiro ensaio, deixou-se uma amostra selada a vácuo numa saqueta de alumínio, selada também a vácuo, com uma saqueta de sílica, que só foi aberta após 25 dias. O seu resultado foi aprovado com melhor desempenho que o apresentado nas mesmas condições no primeiro ensaio, mesmo tendo ficado armazenado por mais dias (anexos A22 a A29).

As possíveis discrepâncias dos resultados podem ser devidas as amostras de composto\_1 utilizadas, assim como do próprio HPLC.

Como no primeiro ensaio, verificou-se novamente que a condição que melhor preserva a estabilidade deste composto é dentro de saco duplo selado a vácuo dentro de um pote plástico. Este promove um menor contacto do produto com o ar.

**Tabela 5 - Condições e resultado do segundo ensaio de estabilidade.**

	<b>Lt inicial</b>	<b>Nó simples</b>	<b>Duplo + pote</b>	<b>Duplo + frio</b>	<b>Alumínio</b>	<b>Alumínio + frio</b>	<b>Alumínio sem sílica</b>	<b>Alumínio 25dias</b>
Convertido (%)	<b>92,42</b>	93,45	95,76	95,52	92,87	95,59	94,42	95,82
Por converter (%)	<b>3,413</b>	2,82	0,69	0,50	2,88	1,02	2,56	2,24

Ainda que este método se demonstre vantajoso pelo facto de não ser utilizado qualquer solvente, o reagente pode ser reaproveitado, aumentando a sua rentabilidade, no entanto, a longo prazo é desaconselhado. A sua utilização para a produção do reagente auxiliar na escala piloto do kilolab, devido à sua reatividade e libertação de gases perigosos, ataca as componentes metálicas do reator, danificando-o e contaminando o produto.

### 2.2.2 Métodos alternativos

Tendo em conta o exposto anteriormente, procurou-se um método que fornecesse condições mais suaves para a preparação deste composto e que evitasse também a libertação de gases perigosos.

Da literatura citada na introdução, os métodos que melhor se adequavam a este tipo de preparação foram por via de anidrido misto e reações do tipo de Appel.

#### 2.2.2.1 Anidrido Misto

Numa primeira abordagem, propôs-se encontrar um método que pudesse transformar a nossa matéria-prima, Matéria-prima\_1, num anidrido misto que reagisse do mesmo modo que o reagente auxiliar no teste de desempenho, visto que os anidridos, embora menos que os cloretos de ácido, são também reativos em água.

Da pesquisa bibliográfica efetuada, foi encontrado o trabalho do Charles Hoppel (54) no qual aplicava a transformação do ácido carboxílico em anidrido misto, utilizando solvente\_4 como solvente, reagente\_5 para desprotonar o ácido carboxílico e reagente\_9 para a formação do anidrido, esquema 28.



Esquema 23- Mecanismo reacional para a formação do anidrido misto. R= Et, Bz

Aplicando esta metodologia, depois de filtrados os sais de amina e de evaporado o solvente, resultou um resíduo viscoso. Retirou-se uma pequena amostra, dissolvendo-a em solvente\_4, aplicou-se numa célula de cloreto de sódio para efetuar o seu infravermelho, anexo 8, que revelou, ainda que fraco, um desdobramento esperado da banda do grupo carbonilo, do anidrido a 1780 cm<sup>-1</sup>.

Ao aplicar o teste de desempenho a este novo intermediário, não se verificou quaisquer alterações. A amostra retirada não mostrou qualquer conversão. Visto este ser menos reativo que o cloreto de ácido, deixou-se o teste à decorrer a temperatura ambiente, no entanto, ao retirar uma nova amostra, continuou sem haver conversão no API desejado, houve porventura a formação do epímero do composto\_1.

Este tipo de compostos ainda que isoláveis só duram umas horas. (14)

Os anidridos de ácidos carboxílicos têm dois grupos carbonilos que teoricamente podem participar na aminólise para dar a ligação amida (55). Deste modo é necessário planejar as condições reacionais para que o carbonilo desejado participe na reação, sendo a eletrofilicidade e impedimento estereoquímico fatores determinantes. Com isto o carbonilo com menor densidade eletrônica e menor impedimento será o carbonilo a que irá sofrer o ataque nucleofílico e neste caso o grupo do Reagente\_1 é bem mais volumoso que reagente\_9. Num estudo feito por Anderson *et al.* (56) otimizou-se as condições reacionais para reações via anidrido misto, no qual indicava o melhor solvente, base e temperaturas. Deste modo decidiu-se então utilizar, como indicado, o reagente\_10 como a base terciária, procurou-se também um ligando mais volumoso que pudesse favorecer o ataque no carbonilo desejado, tendo-se utilizado para este efeito o reagente\_11.

Ao utilizar estas novas implementações no processo, ao filtrar os sais amina resultantes, observou-se que estes se tornavam viscosos, ainda assim foram recolhidos e colocados também a secar na estufa. Assumindo que a reação deu o composto desejado ao efetuar-se o rendimento molar verificou-se, que este ultrapassaria os 100%, o que levou a questionar se com este método a matéria-prima perdia o cloridrato, com o uso da base, ou se este se mantinha, ainda assim refazendo os cálculos com a massa assumindo que este continua presente, continuava acima dos 100% e não havendo outro modo de caracterização do composto além do infravermelho, não foi possível obter uma conclusão.

Ainda assim efetuou-se o teste de desempenho no qual novamente não apresentava qualquer conversão.

Perante tais resultados foi excluída esta hipótese de via alternativa, pelo que se deu início à investigação das reações tipo Appel.

### 2.2.2.2 Reação tipo Appel

Inicialmente como descrito na introdução, observou-se logo que seria impossível utilizar a reação de Appel, devido à presença do tetracloreto de carbono, visto ter sido proibida a sua utilização industrial pelo programa REACH.

No entanto, este tipo de reação tem sido extensivamente estudada.

Após observar os vários resultados obtidos nos trabalhos de Chavasiri e Jang (29) (57) (58), nos quais expõem agentes clorantes alternativos, escolheu-se o reagente\_12, sendo apresentado como a melhor opção para a conversão de ácidos carboxílicos em cloretos de ácido.

A reação decorre de modo semelhante ao descrito no esquema 12.

O procedimento adotado mencionava que a reação decorria em ambiente inerte de argon, não estando disponível utilizou-se azoto, no entanto, ao efetuar a reação ao ar não se observou diferença nos resultados finais.

A reação entre o reagente\_13 e o reagente\_12 é exotérmica, por isso num primeiro ensaio, adicionou-se gota-a-gota para evitar um aquecimento brusco da reação, mantendo-a sempre nos 25 °C. Finda a adição ficou sob agitação durante o período indicado, foi alterando de cor passando de um amarelo, laranja e acabando castanha.

Depois de filtrado e seco o produto, finalizou-se com o teste de desempenho que revelou dados animadores, indicando conversão no API na ordem dos 77%.

Sendo um procedimento de simples execução, decidiu-se aprofundar o seu estudo. Visto que a reação é exotérmica procurou-se também realizá-la em diferentes temperaturas, tabela 6.

Num segundo ensaio, arrefeceu-se a solução a 0 °C, adicionando lentamente de modo a evitar um aumento na temperatura, observando-se que a cor ficou apenas amarela ao contrário do ensaio inicial.

O teste de desempenho deste ensaio apresentou uma conversão menor.

**Tabela 6 - Condições reacionais e resultados obtidos.**

Ensaio	Reagente_13 (eq)	Reagente_12 (eq)	Solvente	Temp (°C)	t (min)	Rendimento Molar (%)	Teste de desempenho	Conv/P.Conv (%)
1						67	N.a	77,35/18,38
2						53	N.a	65,56/31,15
3						51	N.a	88,15/6,29
4			Confidencial			47	N.a	69,53/27,23
5						59	N.a	82,69/10,93
6						61	Aprovado	90,94/2,96
7						64	N.a	75,59/20,8

No terceiro ensaio, aqueceu-se a solução a uma determinada temperatura ligando um condensador para refluxar o solvente. A reação decorreu normalmente onde se verificou as várias alterações na coloração da solução. O teste de desempenho apresentou uma conversão maior, 88% apresentando também apenas 6% de composto\_1 por converter.

Num quarto ensaio pretendeu-se verificar se haveria alterações ao procedimento inicial utilizando um maior número de equivalentes quer da reagente\_13 como do reagente\_12. Pelo teste de desempenho revelou ter uma pior conversão.

Não havendo melhorias no aumento da quantidade de reagentes, procurou-se aumentar então o tempo de reação.

No ensaio 5, utilizou-se uma ampola que se mostrou deficiente, para a adição da solução de reagente\_13, para deste modo perder a menor quantidade possível, teve que ser adicionado rapidamente, levando a que a temperatura da solução subisse. Esta foi deixada a arrefecer no decorrer das 2 horas reacionais. O teste de desempenho obtido mostrou uma menor conversão, havendo uma maior quantidade de intermediário por reagir.

Por sua vez no ensaio 6, a adição foi mais cuidadosa, não deixando a temperatura ultrapassar uma certa temperatura. O teste de desempenho apresentou uma conversão de 91% com cerca de 3% por reagir, sendo aprovado mediante os critérios exigidos.

De acordo com a literatura, procurou-se efetuar um ensaio onde foi utilizado acetonitrilo como solvente, no entanto este provou ser mais moroso, visto que a reagente\_12 não se dissolve neste solvente, teve que ser dissolvido num pouco de solvente\_4 para poder proceder com a reação. Ainda assim a conversão foi menor.

Efetuuou-se um *scale up*, utilizando estas condições otimizadas, mantendo o ratio mas aumentando a quantidade de reagentes utilizada. Devido à grande quantidade de reagente\_12 a adicionar, utilizou-se um banho de gelo para poder fazer uma adição mais rápida sem que a temperatura se aumentasse significativamente. No entanto o teste de espaçador não foi aprovado, apresentando o intermediário com 8%. O produto obtido duplicou a sua massa, obtendo um rendimento molar de 138% tendo ocorrido possivelmente a precipitação da reagente\_13.

Mesmo não tendo sido aprovado, continuou-se com a produção da API\_1, descrito em 6.2.6, com o cloreto de ácido produzido por este método e foi possível

sintetiza-lo (47%) com uma pureza cromatográfica de 94% (anexo 39) antes de seguir para o passo de purificação, descrito em 6.2.7.. Obteve-se um pó com uma cor acastanhada semelhante ao do composto\_1, ao efetuar a purificação da API\_1 esta ficou com uma cor laranja, apresentando uma pureza cromatográfica final de 99%.(anexo A40), com um rendimento molar de 44%.

Ao realizar um segundo ensaio nas mesmas condições o reagente auxiliar foi obtido desta vez com um rendimento molar de 73%, e como o ensaio anterior este também não foi aprovado segundo o parâmetro de aceitação, contudo, este foi novamente utilizado para a produção da API\_1, tendo sido obtida com um rendimento molar de 71%, a purificação foi feita e conseguida com um rendimento molar de 60%.

Outro reagente que escolhido foi o reagente\_14. Ainda que este também tenha um tempo de meia vida longo, 44 anos, (59) na atmosfera, não está listado como um depletor de ozono (classe 1 ou 2). Caso este atinga a estratosfera, a fotólise iria ocorrer, mas não numa taxa ambiental significativa.

Não é evidente que este sistema transfira um átomo de bromo comparativamente a um átomo de cloro, a literatura indica de que pode depender do substrato e há indícios de misturas de alcanos bromados e clorados quando aplicado a álcoois. (60)

Do mesmo modo, como no método anterior este procedimento é de fácil execução, seguindo a exemplo do trabalho de Thiemann (60), iniciou-se o estudo deste sistema aplicando apenas um equivalente de reagente\_13 para dois de reagente\_14, tabela 7.

**Tabela 7 - Condições reacionais e resultados obtidos.**

Ensaio	Reagente_13 (eq)	Reagente_14 (eq)	Solvente	Temp (°C)	t (min)	Rendimento Molar (%)	Teste de desempenho	Conv/P.Conv
1						86	N.a	78,16/17,45
2						76	N.a	44,55/51,07
3		Confidencial				73	N.a	80,79/14,96
4						52	N.a	88,28/8,06
5						78	Aprovado	94,66/1,81



Os rendimentos molares foram calculados assumindo que o composto final era o pretendido.

A única diferença imediata deste sistema para o anterior é a alteração do agente clorante, deste modo decidiu-se num primeiro ensaio, adicionar os reagentes de acordo com o método anterior, isto é, adicionar o agente clorante e de seguida uma solução de reagente\_13. Deste modo a reação começou a ficar esbranquiçada e pastosa, ainda assim foi possível recolher um precipitado, que depois de seco revelou pelo teste de desempenho a conversão na ordem dos 78%.

Visto que a reação não decorreu como previsto, na literatura, repetiu-se o ensaio, no qual se dissolveu a reagente\_13 em solvente\_4 e de seguida adicionou-se o reagente\_14, e como era indicado a solução mudou de cor, alternando de um amarelo para laranja, terminando com um tom castanho-escuro, e foi aos poucos subindo a temperatura. Depois de a temperatura estabilizar é então adicionado o cloridrato. A solução voltou a mudar de cor, passando do tom escuro para um laranja. Ainda que tenha decorrido como o esperado pela literatura, o resultado do teste de desempenho mostrou-se gravemente afetado com apenas 45% de conversão.

Nos ensaios seguintes continuou-se a aumentar os equivalentes e observou-se que enquanto se aumentava as quantidades dos reagentes, melhorava o desempenho do produto final obtido.

Quando se efetuou a reação com um certo numero de equivalentes de cada, pelo mesmo período de tempo, o produto final apresentava um desempenho aceitável, e comparável com os obtidos quando utilizado o método *standard*, para prosseguir com a síntese do API.

Ao efetuar um *scale up* nestas condições o resultado foi reprodutível, obtendo inclusivamente uma conversão maior ainda de 96% com apenas quantidades vestigiais de 9-amino-MIN por converter (anexo A46).

Ainda que não seja certo, pôde-se verificar que o cloreto de ácido resultante deste método é menos estável. Ao tentar produzir a API\_1 partindo do cloreto de ácido produzido por este método, apenas 4 dias após o teste de desempenho, observou-se que, a amostra retirada indicava agora apenas uma conversão de 67% e uma quantidade significativa do intermediário por converter, 27% (Anexo A47). Este

ensaio não precipitou como era suposto, foi deixado no frigorífico para que precipitasse, mas devido ao tempo armazenado, degradou-se.

Ao contrário do método *standard*, o cloreto de ácido obtido por este método deve ser utilizado, preferencialmente, com maior brevidade possível. Face ao método *standard*, este apresenta várias melhorias, desde menores tempos reacionais, menos exigência elétrica pois não necessita de aquecimento, nem gasto de neve carbónica para os arrefecimentos, não há libertação de gases, logo não necessita *trap*, tudo em condições que não danificarão os reatores, contribuindo assim para uma a sua longevidade destes. No entanto, é impossível a separação dos reagentes de partida e sua reutilização.



## Capítulo 3 | ESTUDO DA VIABILIDADE ECÓNOMICA

### 3.1 Gastos Laboratoriais

Nesta dissertação, pretendia-se verificar a viabilidade do reagente auxiliar para a preparação de um API, assim como arranjar novos métodos para a síntese do mesmo, que fossem igualmente eficientes, sem “*work-ups*” muito exaustivos e extensivos utilizando o mínimo de solventes possível.

Na tabela seguinte serão apresentados os reagentes que se utilizaram, apresentando as quantidades gastas e o custo associado mediante o preço estabelecido pelo respetivo fornecedor.

Tabela 8 - Estimativa do custo associado a todos os reagentes face às quantidades utilizadas.

Reagente	Preço kg/L (€)	Qtd	Custo
Confidencial			5,80 €
			1,58 €
			16,13 €
			5,42 €
			8,36 €
			190,50 €
			32,50 €
			3,68 €
			77,28 €
			7,80 €
			1,49 €
			0,36 €
			1,61 €
			6,82 €
			81,27 €
			1,14 €
			55,65 €
			1,76 €
			1,54 €
			391,56 €
			89,25 €
			20,67 €
			112,74 €
			4,03 €
			32,68 €
TOTAL			1.145,81 €

Nesta estimativa de custos não foram tidos em conta os gastos de água (p.e banho de aquecimento) o material utilizado, nem a mão-de-obra, o que certamente aumentaria de um modo exponencial esta estimativa.

Para saber se de facto a produção *in-house* é preferencial, é necessário ter em conta a energia despendida, deste modo é imperativo fazer-se um balanço energético.

### 3.2 Balanço Energético

Para que seja possível calcular o balanço energético de todos os processos efetuados nesta dissertação é necessário ter em conta a sua termodinâmica e ver ao pormenor as entalpias associadas.

Em seguida serão representados os esquemas das reações para que de um modo simples, possa indicar os valores das entalpias de formação padrão, em kJ/mol, respetivas e necessárias para este cálculo.

Figura 5 - Primeiro passo reacional para a produção do matéria-prima\_1

CONFIDENCIAL

Figura 6 - Ultimo passo reacional para a produção do matéria-prima\_1

CONFIDENCIAL

Figura 7 - Formação do intermediário\_1 pelo Reagente\_7

CONFIDENCIAL

Figura 8 – Formação do intermediário\_1 pelo sistema reagente\_13/agente clorante

CONFIDENCIAL

Muitas das espécies com que trabalhei não tem valores padrão conhecidos. Deste modo teve-se que efetuar aproximações pelos valores médios das energias de ligação (tabela 9), isto porque:

$$\Delta H_{\text{reac}} = E_{\text{ligação quebrada}} - E_{\text{ligação formada}} \quad (1)$$

$$\Delta H_{\text{reac}} = \Delta H_{\text{prod}} - \Delta H_{\text{reag}} \quad (2)$$

Tabela 9 - Valores médios de energias de ligação em kJ/mol (61)

Tipo de ligação	kJ/mol
C-Br	285
C-Cl	327
C-H	411
C-O	358
H-Br	362
H-Cl	428
N-C	305
N-H	386
P=O	544
O-H	459
S-Cl	255
S=O	522

Para encontrar um valor aproximado da entalpia padrão de formação do Reagente\_2, assumiu-se uma reação de esterificação entre o ácido bromoacético com tert-butanol, esquema 29, com entalpias de formação padrão conhecidas, -393,09 kJ/mol e -360,04 kJ/mol, respetivamente.

## CONFIDENCIAL

### Esquema 24 - Reação de esterificação

Pela equação (1) temos que:

$$\Delta H_{\text{reac}} = \text{O-H} + \text{C-O} - (\text{C-O} + 2\text{O-H}) = -459 \text{ kJ/mol}$$

Substituindo os valores na equação (2), temos que:

$$\Delta H_{\text{reac}} = \Delta H_{\text{prod}} - \Delta H_{\text{reag}} \Leftrightarrow -459 = x + (-285,8) - ((-393,09) + (-360,04)) \Leftrightarrow$$

$$x = -459 - 467,33 \Leftrightarrow x = -926,33 \text{ kJ/mol}$$

Do mesmo modo, não existindo informação relativa à entalpia de formação padrão do Produto\_secundário\_1, esquema 30, foi utilizada uma aproximação tendo em conta a sua formação em meio aquoso, utilizando valores de entalpia padrão do

ião amônio, ião brometo e ácido bromídrico no estado gasoso, -120 kJ/mol, -132,8 kJ/mol, -36,3 kJ/mol respectivamente.

## CONFIDENCIAL

### Esquema 25 - Formação do Produto\_secundário\_1.

Pela equação (2), temos que

$$\Delta H_{\text{reac}} = \Delta H_{\text{prod}} - \Delta H_{\text{reag}} \Leftrightarrow \Delta H_{\text{reac}} = -120,9 + (-132,8) - ((-150,6) + (-36,48))$$

$\Leftrightarrow$

$$\Delta H_{\text{reac}} = -66.62 \text{ kJ/mol.}$$

Olhando para a reação da figura 7, pela equação (1) temos:

$$\Delta H_{\text{reac}} = \text{N-H} + \text{C-Br} - (\text{N-C} + \text{H-Br}) = 4 \text{ kJ/mol}$$

Substituindo agora todos os valores obtidos anteriormente na equação (2), temos então:

$$\Delta H_{\text{reac}} = \Delta H_{\text{prod}} - \Delta H_{\text{reag}} \Leftrightarrow 4 = -66,62 + x - (2 (-150,6) + (-926,33)) \Leftrightarrow$$

$$x = -1156.91 \text{ kJ/mol}$$

Sendo este o valor de entalpia para o intermediário 1-tert-butilamino-3,3-dimetilbutan-2-ona.

Em seguida olhando a reação da figura 8, temos  $\Delta H_{\text{reac}} = 0 \text{ kJ/mol}$ , uma vez que as ligações formadas e quebradas são as mesmas. Assim sendo substituindo na equação (2) temos:

$$\Delta H_{\text{reac}} = \Delta H_{\text{prod}} - \Delta H_{\text{reag}} \Leftrightarrow 0 = x + (-360,04) - ((-1156.91) + (-167.16) + (-285.8)) \Leftrightarrow$$

$$x = -1249.83 \text{ kJ/mol}$$

Este foi o valor obtido de entalpia para o matéria-prima\_1.

Ainda que com valores médios e aproximações, os resultados obtidos encontram-se de acordo com o observável na prática. A reação para a produção da matéria-prima, são altamente exotérmicas.

Inicialmente para encontrar a entalpia de formação para o cloreto do matéria-prima\_1, tendo em conta os valores encontrados da literatura, fez-se uma aproximação assumindo a reação entre o ácido acético com o reagente\_14 e a

reagente\_13, esquema 31, onde todos os valores, exceto o do bromodiclorometano, são conhecidos.

### CONFIDENCIAL

#### Esquema 26 - Reação entre ácido acético e o sistema de reagente\_13 / reagente\_14

Deste modo pela equação (1) temos:

$$\Delta H_{\text{reac}} = \text{C-O} + \text{O-H} + \text{C-Cl} - (\text{C-Cl} + \text{C-H} + \text{P=O}) \Leftrightarrow \Delta H_{\text{reac}} = -138 \text{ kJ/mol}$$

Substituindo os valores conhecidos na segunda equação temos:

$$\Delta H_{\text{reac}} = \Delta H_{\text{prod}} - \Delta H_{\text{reag}} \Leftrightarrow -138 = -273,80 + x + (-112,1) - ((-484,5) + (-33,201) + 211,3) \Leftrightarrow x = -58,501 \text{ kJ/mol}$$

Obtido este valor, pode-se agora olhar para a reação da figura 10, com os valores obtidos anteriormente, calcular-se a entalpia de formação do cloreto de ácido, substituindo na equação (2):

$$\Delta H_{\text{reac}} = \Delta H_{\text{prod}} - \Delta H_{\text{reag}} \Leftrightarrow -138 = x + (-58,501) + (-112,1) - ((-1249,83) + (-33,201) + 211,3) \Leftrightarrow x = -1039,13 \text{ kJ/mol}$$

Sabendo-se agora todos os valores é possível calcular o  $\Delta H_{\text{reac}}$ , da reação da figura 9.

Onde obtemos:

$$\Delta H_{\text{reac}} = \Delta H_{\text{prod}} - \Delta H_{\text{reag}} \Leftrightarrow \Delta H_{\text{reac}} = (-296,8) + (-92,31) + (-1039,13) - ((-245,6) + (-1249,83)) \Leftrightarrow \Delta H_{\text{reac}} = 67,19 \text{ kJ/mol}$$

Por sua vez, calculando o mesmo  $\Delta H_{\text{reac}}$  pela equação (1) utilizando os valores médios de ligação temos:

$$\Delta H_{\text{reac}} = 2(\text{S-Cl}) + \text{C-O} + \text{O-H} - (\text{S=O} + \text{H-Cl} + \text{C-Cl}) \Leftrightarrow \Delta H_{\text{reac}} = 50 \text{ kJ/mol}$$

Verificando-se um erro de 25% entre eles.

Não foram efetuados os cálculos referentes ao sistema reagente\_13/reagente\_12 por falta de dados, no entanto podemos assumir o seu valor de entalpia de reação de -138 kJ/mol visto tratar-se das mesmas ligações formadas e quebradas que no sistema utilizado anteriormente.



Assumiu-se que se trabalhava num reator isotérmico à temperatura de refluxo (80 °C – 353 K). Como não foi possível encontrar valores de capacidade térmica dos vários componentes, assumiu-se que este não varia com a temperatura, ou seja:

$$\Delta H_{reac} = \Delta H_{298}^{\circ} + \int_{298}^{353} (\sum C_{p_{prod}} - \sum C_{p_{reag}}) dT \Leftrightarrow \Delta H_{reac} = \Delta H_{298}^{\circ} + (\sum C_{p_{prod}} - \sum C_{p_{reag}})(353 - 298)$$

$$\text{Onde } \sum C_{p_{prod}} - \sum C_{p_{reag}} = 0$$

$$\text{Logo } \Delta H_{reac} = \Delta H_{298}^{\circ}$$

Pelo princípio da conservação da energia temos:

$$Q + \Delta H_{reac} = 0 \quad (3)$$

Logo temos, p.e, para a reação de produção do cloreto de ácido, de fornecer 67,10 kJ por mole de produto. Se quisermos produzir um kilo deste produto temos, nesse kilo 5,37 mol, ou seja seria necessário fornecer ao sistema 360,75 kJ

As placas de aquecimento são sistemas de pouca eficiência. Assumindo que a placa de aquecimento tem uma perda de calor para com o exterior de 30%, tendo em conta a dissipação de calor pelo fluido de aquecimento, p.e água.

Temos que:

$$Q = Q_{aquecimento} + Q_{perda} \Leftrightarrow Q_{aquecimento} = 468,97 \text{ kJ}$$

Ou seja é necessário fornecer 468,97 kJ de energia para poder fornecer a energia necessária à reação, para a produção de 1 kg, de modo a compensar as perdas.

Sabendo-se que o refluxo é mantido por quatro horas, podemos saber quantos kWh são usados para fornecer ao nosso sistema a energia necessária.

Pela conversão temos:

$$\frac{468,97 \text{ kJ}}{3600s} = 0,130 \text{ kWh}$$

Logo pelas quatro horas gastou-se 0,52 kWh.

Para o caso da reação de produção da matéria-prima, figura 7, como foi assumido a entalpia pelas ligações quebradas e formadas onde temos um  $\Delta H_{reac} = 4 \text{ kJ/mol}$ .

Novamente para a produção de 1kg de produto temos 5,34 mol, logo teoricamente seria necessário fornecer 21,36 kJ.

Novamente atendendo às perdas de calor para o exterior temos 27,77 kJ. Que por sua vez corresponde a 0,0077 kWh.

O segundo passo desta reação é altamente exotérmico, ainda que teoricamente o  $\Delta H_{reac} = 0 \text{ kJ/mol}$ , quando calculado pelas energias quebradas e formadas.

De modo semelhante podemos saber quantos kWh são gastos também para a utilização de aparelhos como o rotavapor.

Assumindo que o banho deste leva 3L de água, esta é aquecida aos 60 °C, p.e, partindo inicialmente da temperatura ambiente, sabendo o seu Cp podemos calcular o calor fornecido pela expressão

$$Q = m \cdot c \cdot \Delta T \quad (4)$$

Substituindo temos:

$$Q = 3000 \times 4,186 \times (60-20) \Leftrightarrow Q = 502,32 \text{ kJ}$$

Assumindo uma perda de calor semelhante ao de uma placa de aquecimento temos então uma energia de 653,016 kJ. Como este aparelho é bastante utilizado assumindo que esteve ligado durante todo o tempo de período de trabalho diário, isto é 9 horas, assumindo-se só o período de um turno no qual esta dissertação foi feita. Temos um gasto diário de 1,632 kWh, equivalente a um gasto mensal de 48,96 kWh.

Sabendo que a entidade fornecedora de energia, à qual a Cipan está vinculada, estabelece um preço, por kWh, de **X** centimos podemos calcular o custo energético associado à produção quer da matéria-prima quer do reagente auxiliar.

Gastou-se, a nível energético 589 centimos por mês.

### 3.3 Viabilidade económica

Como se pode verificar pelos resultados obtidos, a nível laboratorial, é possível a preparação da matéria-prima do reagente auxiliar com bom rendimento, utilizando 24% menos quantidade de reagentes e por sinal utilizando um reagente para a sua

preparação mais barato (81,5% mais barato), que a compra direta desta matéria-prima. O produto secundário obtido neste procedimento também é vendável o que irá ajudar a diminuir os custos associados à produção da matéria-prima para o reagente auxiliar.

O procedimento de fabrico desta matéria-prima já é aplicado no kilolab, escala piloto (*scale-up*), com bons resultados e rendimentos idênticos aos conseguidos no LDNP. Sendo esta melhoria é apenas um ajuste ao procedimento atual é possível que a reprodutibilidade deste à escala piloto seja semelhante e assim continuar a permitir a poupança dos reagentes.

Também, através de pequenas alterações ao método atual para a produção do cloreto de ácido, descrito no capítulo 6.2.2.1, é possível reduzir a utilização do solvente\_1 para a lavagem do precipitado em 50%, se em vez de se levar a primeira alíquota de solvente\_1 à secura, seguir logo para a filtração, deixando suspender bem, filtrando e lavando-o com apenas mais uma alíquota, o desempenho do produto não é afetado, mostrando-se reprodutível.

Pelos cálculos das entalpias em jogo nas reações de produção destes compostos, podemos verificar que se as reações forem feitas em reactores paralelos o calor cedido pelas reações exotérmicas poderão ajudar no aquecimento das reações endotérmicas, minimizando assim os custos energéticos.

Podemos observar também que o sistema reagente\_13/agente clorante, apresenta um custo associado mais elevado do que quando simplesmente preparado com o cloreto de tionilo, no entanto tendo em conta as condições reacionais implicadas, torna-se preferível a longo prazo, visto ser possível preparar 2 a 4 vezes mais cloreto de ácido no mesmo período de tempo, sem utilização de sistemas de aquecimento (poupança energética), sem que sejam libertados gases perigosos que reagem com os reatores, como o ácido clorídrico e o dióxido de enxofre, melhorando as condições do seu manuseamento.

Tendo em conta o valor acrescentado do produto final, isto é, o API produzido, torna a produção deste reagente auxiliar lucrativa.

A compra direta do reagente auxiliar, tendo em conta o tempo de entrega e da possibilidade de ser uma vez mais um lote sem a atividade necessária, como indicado na introdução deste trabalho, deixa de ser necessária. Ao produzir o seu próprio

reagente, tem-se maior controlo do processo, assim como temos a garantia de que as matérias-primas estão aptas para esse fim. Reduzindo os custos de ambos os processos da produção, torna-se mais viável para a Cipan a produção própria deste reagente.



## Capítulo 4 | AMBIENTE E SEGURANÇA

Como indicado na introdução, a Cipan implementou o Sistema de Gestão Integrado de Qualidade, Ambiente e Segurança segundo as normas ISO9001:2000, ISO14001:2004, OSHAS 18001:2007 e o Guia de boas práticas de fabrico, segundo a ICH Q7 (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals for Human Use) (62), uma harmonização das guias de boas práticas na manufatura de API's americana, europeia e japonesa.

No período em que decorreu esta dissertação, foi fornecido logo à partida os equipamentos de proteção individuais (EPI) próprios para iniciar os trabalhos nos laboratórios de LDNP do departamento de I&D da Cipan, tais como a bata e sapatos com biqueira de aço. No laboratório encontravam-se outros EPI's para responder aos requisitos de segurança necessários para o manuseamento de substâncias perigosas como as que se esteve de trabalhar, desde luvas de nitrilo e máscaras de proteção, estas foram somente utilizadas para pesagens de reagentes que não podiam ser efetuadas na *hotte*. O cloridrato de 9-amino-MIN e o intermediário\_1 são pós finos que facilmente se suspendiam no ar durante as pesagens, e no caso deste último tinha um cheiro nocivo e irritante.

Todos os reagentes são guardados em armários ventilados, equipados com exaustores. O manuseamento dos reagentes líquidos foi feito ao abrigo das *hottes*, assim como na preparação do reagente auxiliar com o reagente\_7 foi utilizado uma *trap* de lavagem de gases que serve também para evitar a sua libertação para o laboratório. O material utilizado por esta metodologia era lavado e deixado sob acetona até ao dia seguinte. Evitava-se lavar com água ou outros solventes que pudessem reagir com o cloreto de tionilo provocando a libertação de gases.

Devido a recentes iniciativas associadas à filosofia *Lean6sigma*, foi possível a implementação de novas diretrizes que levaram a um melhor uso e aproveitamento dos recursos, levando ao cabo ao aumento da capacidade produtiva máxima em 15% sem qualquer investimento extra em equipamentos ou aumento de pessoal, e melhor gestão de resíduos, no qual a Cipan procedeu a diversas alterações quanto ao seu desempenho ambiental, medidas estas que foram reconhecidas pela Agência Portuguesa do Ambiente, com a emissão da Licença Ambiental nº180/2008, que incentivou a implementação da EPTARI para o tratamento de efluentes.

No fim de cada reação as águas-mãe foram despejadas em bidons identificados e recolhidos sendo estes levados para a destilaria para recuperação de solventes.

Parte que não é recuperada segue para a ETARI, e os resíduos sólidos são armazenados, secos de solventes, e prontos para serem recolhidos por entidades competente.

Na tabela 9, seguem as principais legislações de segurança aplicadas e cumpridas pelo grupo AtralCipan.

**Tabela 10 - Legislação principal de segurança.**

Promoção da segurança e saúde no trabalho	Lei n.º102/2009
Regulamento geral do ruído	Decreto-lei n.º182/2006
Exposição a agentes físicos (vibrações)	Decreto-lei n.º46/2006
Exposição a agentes químicos	Decreto-lei n.º290/2001
Diretiva ATEX	Decreto-lei n.º 236/2003
Diretiva Equipamentos de trabalho	Decreto-lei n.º 50/2005
Recipientes sob pressão	Decreto-lei n.º90/2010
Reservatórios de Combustíveis	Decreto-lei n.º267/2002
Segurança contra incêndios em edifícios	Decreto-lei n.º 208/2008
Acidentes de trabalho e doenças profissionais	Lei n.º100/1997

## Capítulo 5 | CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

No âmbito deste trabalho foram alcançados a maioria dos objetivos propostos no começo desta dissertação.

Foi possível verificar que os métodos aplicados pela CIPAN, para a produção do reagente auxiliar, intermediário\_1, envolvido na produção do API, API\_1, são viáveis, no entanto, a utilização do cloreto de tionilo, ainda que barato e de grande disponibilidade no mercado, deve-se considerar a produção em grande escala, devido à sua grande reatividade e libertação de gases perigosos, que atacam os reatores.

Neste trabalho, conseguiu-se arranjar métodos igualmente eficientes, viáveis, promovidos por condições reacionais mais brandas, a temperatura ambiente, e económicos, em termos de tempo e energia, sendo possível produzir 3 a 4 vezes mais reagente auxiliar no mesmo período de tempo que pelo método atual.

Ainda que o sistema reagente\_13/reagente\_14 ou reagente\_12, sejam reagentes que causam danos no meio aquático, a presença da ETARI é fundamental no tratamento dos efluentes causados por estes novos métodos.

Estes novos métodos não foram aplicados a escala do kilograma, o laboratório de escala piloto, kilolab, esteve em utilização para a produção de lotes para a venda a clientes.

As perspetivas futuras, relativamente a este trabalho será a aplicação destas metodologias na escala piloto e a contínua procura de novos métodos possíveis de aplicação à escala industrial, e a contínua melhoria dos procedimentos atuais para a produção em larga escala da API\_1, para que em 2016 com o término da patente a CIPAN possa tornar-se uma fornecedora competitiva.



## Capítulo 6 | PARTE EXPERIMENTAL

### 6.1 Material e Reagentes

Para a realização das pesagens foi utilizada uma balança digital da marca Mettler Toledo, modelo PB602 (precisão  $\pm 10^{-2}$  g), calibrada semanalmente com uma massa certificada Soquilabo. Para medições de pH foi utilizado equipamento Metrohm 620, calibrado utilizando padrões fosfato e ftalato (pH 7 e 4, respectivamente) da *Fisher Scientific*. Para a concentração das soluções reacionais e/ou secagem de solvente das mesmas foi utilizado o evaporador rotativo da marca BÜCHI, banho modelo Waterbath B-480 e Rotador R-114, onde salmoura foi usada como líquido refrigerante. O material de vidro utilizado para todo o suporte das reações era da VWR e PYREX®, as mantas de aquecimento Heidolph MR3007 Control, o agitador mecânico Heidolph RZR7020. As análises cromatográficas foram efetuadas em coluna Hypersil BDS-C18, 5 $\mu$ m (250x4,6mm).

Todos os compostos foram secados em Estufas Heraeus.

Os espectros de infravermelho foram realizados num Perkin Elmer 1600 Series FTIR, e as pastilhas preparadas com Brometo de Potássio (KBr) numa prensa SPECAC 15.011, para analisar compostos líquidos foram usadas pastilhas de cloreto de sódio.

Os reagentes utilizados foram obtidos da Sigma-Aldrich, Fluka, Merk, Acros Organics e Riedel-de Haën e da própria destilaria da Cipan.

### 6.2 Sínteses

#### 6.2.1 Matéria-prima\_1

##### 6.2.1.1 Método *Standard* (49)

CONFIDENCIAL

**6.2.1.2 Monocarboximetilação de aminas primárias (50)**

CONFIDENCIAL

**6.2.1.3 Monocarboximetilação de aminas primárias (51)**

CONFIDENCIAL

**6.2.1.4 Monocarboximetilação de aminas primárias (52)**

CONFIDENCIAL

**6.2.1.5 *N*-tert-butilglicina (53)**

CONFIDENCIAL

**6.2.2 Intermediário\_1**

CONFIDENCIAL

**6.2.2.1 Método *Standard* (63)**

CONFIDENCIAL

**6.2.2.2 Vilsmeier-Haack (49) (64) (65)**

CONFIDENCIAL

**6.2.3 Anidrido mistos**

CONFIDENCIAL

**6.2.4 Reação de Appel**

**6.2.4.1 Reagente\_13/Reagente\_12 (57) (58)**

CONFIDENCIAL

**6.2.4.2 Reagente\_13/Reagente\_14 (60)**

CONFIDENCIAL

**6.2.5 Teste de desempenho**

CONFIDENCIAL

**6.2.6 API\_1 bruta**

CONFIDENCIAL

**6.2.7 API\_1 Pura**

CONFIDENCIAL

## Bibliografia

1. Merckgroup. A successful history. [Online] 2012. [Citação: 28 de 11 de 2012.] <http://www.merckgroup.com/en/company/history/history.html>.
2. gsk.com. Our History. [Online] 16 de agosto de 2012. [Citação: 28 de 11 de 2012.] <http://www.gsk.com/about-us/our-history.html>.
3. Pfizer. A Pioneering Spirit on the Frontiers of Medicine. *Pfizer*. [Online] 2012. [Citação: 28 de 11 de 2012.] <http://www.pfizer.com/about/history/timeline.jsp>.
4. Maddi, Eswar Gupta. The History of the Pharmaceutical Industry. *Scribd*. [Online] 2012. [Citação: 28 de 11 de 2012.] <http://pt.scribd.com/doc/21734187/History-of-Pharmaceutical-Industry>.
5. FDA. Kefauver-Harris Amendments Revolutionized Drug Development. *U.S Food and Drug Administration*. [Online] 10 de Novembro de 2012. [Citação: 28 de Novembro de 2012.] <http://www.fda.gov/ForConsumers/ConsumerUpdates/ucm322856.htm>.
6. Paddock, Catharine. Chance Of Surviving Once-Deadly Cancers Doubled Since 1970s. *Medical News Today*. [Online] 12 de julho de 2010. [Citação: 29 de 11 de 2012.] <http://www.medicalnewstoday.com/articles/194406.php>.
7. "Excess in the pharmaceutical industry". Angell, Marcia. 2004, Canadian Medical Association Journal vol. 171 no. 12 , pp. 1451–3.
8. Baltazar, Amanda. The Hatch-Waxman Act. *About.com*. [Online] 2012. [Citação: 29 de 11 de 2012.] <http://pharmacy.about.com/od/Glossary/a/The-Hatch-Waxman-Act.htm>.
9. Portugal overview. *Portugaloffer.com*. [Online] 2003. [Citação: 30 de 11 de 2012.] [http://www.portugaloffer.com/about\\_us/portugal.html](http://www.portugaloffer.com/about_us/portugal.html).
10. Apifarma. A industria farmaceutica em números. *Apifarma*. [Online] 2012. [Citação: 5 de Dezembro de 2012.] <http://www.apifarma.pt/publicacoes/ifnumeros/Documents/IFemnumeros2011.pdf>.
11. PharmaPortugal. Apresentação PharmaPortugal. *pharmaportugal*. [Online] 5 de 2006. [Citação: 5 de 12 de 2012.] [http://www.pharmaportugal.com/facts\\_figures2.htm](http://www.pharmaportugal.com/facts_figures2.htm).
12. *Amide bond formation and peptide coupling*. Montalbetti, Christian. UK : ELSEVIER, 2005, Tetrahedron, Vol. 61, pp. 10827-10852.

13. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. Valeur, Eric. s.l. : The Royal Society of Chemistry, 2009, Chem. Soc. Rev., pp. 606-631.
14. Evolution of amide bond formation. Joullié, Madeleine. U.S.A : ARKAT USA, Inc, 2010, ARKIVOC, Vol. 8, pp. 189-250. 1551-7012.
15. N-Acylation in non-aqueous and aqueous medium- method of amide synthesis in non-peptide compounds. Rajput, Ambersing. 3, India : Scholars Research Library, 2011, Der Pharma Chemica, Vol. 3, pp. 409-421. 0975-413X.
16. Pizey, J. S. Synthetic Reagents, Ed., Vol. 1., New York : Wiley, 1974. p. 321.
17. Spencer, Knapp. In Organic Syntheses; Collect. Vol.IX. New York : Wiley, 1998, p. 516.
18. Adams, R., Ulrich, L. H. 1920, J. Am. Chem. Soc., 42., pp. 599–611.
19. Pearson, A. J. Handbook of Reagents for Organic Synthesis: Activating Agents and Protecting Groups; Ed.;. New York : wiley, 1999, p. 333.
20. J. Prakt. Chem. (Leipzig). Klosa, J. 1962, pp. 45-55.
21. Townend, Robert V. 1936739 United States, 1930.
22. Encyclopedia of reagents for organic synthesis. . Paquette, L. A. 1995, pp. 2045-2047.
23. Venkataraman, K. 1979, Tetrahedron Lett. Vol.32, pp. 3037-3040.
24. "Tertiary Phosphane/Tetrachloromethane, a Versatile Reagent for Chlorination, Dehydration, and P-N Linkage". . Appel, Rolf. 1975, Angewandte Chemie International Edition in English Vol.14 No.12, pp. 801-811.
25. Environmental Health Criteria . Fouw, J. de. Geneva : s.n., 1999, Vol. 208.
26. The Atlas of Climate Change. Dow, K. e Downing, T.E. 2006.
27. Villeneuve, G. B. 1997, Tetrahedron Lett. Vol.38, pp. 6489–6492.
28. Skydow. 2009, Bull. Korean Chem. Soc., 2009 Vol. 30 No 9, p. 2066.
29. Reactivity of chlorinating agents/PPh<sub>3</sub> for the chlorination of alcohols and carboxylic acids: a comparative study. W. Pluempunapat, Doo Ok Jangb, W. Chavasiria. s.l. : Elsevier, 2007, Tetrahedron Letters, Vol. 48, pp. 223-226.
30. Ghosez, L. 1979, J. Chem. Soc., Chem. Commun. , pp. 1180-1181.
31. Nucleophilic Acyl Substitution via Aromatic Cation Activation of Carboxylic Acids: Rapid Generation of Acid Chlorides under Mild Conditions. D. J. Hardee, L.

Kovalchuke, T. H. Lambert,, 2010, 132, 5002-5003. 2010, J. Am. Chem. Soc. Vol 132 No 14, pp. 5002-5003.

32. Synthesis of diisopropylcyclopropanone and X-ray structure of its dichlorodimethyltin(IV) adduct. Curnow, Owen J. 2006, ARKIVOC, pp. 43-47.

33. Amide bond formation by using amino acid fluorides. Lippert, John W. 2005, ARKIVOC, pp. 87-95.

34. Preparation of acyl fluorides with hydrogen fluoride-pyridine and 1,3-dicyclohexylcarbodiimide. Chen, Chinpiao. 2002, Journal of Fluorine Chemistry vol.115 , pp. 75-77.

35. Carpino, L. A. e El-Faham, A. 1995, J. Am. Chem. Soc., pp. 5401-5402.

36. El-Faham, A. 1998, Chem. Lett., pp. 671-672.

37. Froeyen, P. 1995, Synth. Commun., pp. 959-968.

38. Curtius, Th. 1902, Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft , pp. 3226-3228.

39. Shioiri, T. 1972, J. Am. Chem. Soc., pp. 6203-6205.

40. Undecyl isocyanate. Allen, C. F. H. 1955, Org. Synth.; Coll. Vol. 3, p. 846.

41. Recent developments in the carbodiimide chemistry . Mikolajczyk, M. e Kielbasinski, P. 1981, Tetrahedron, pp. 233-284.

42. Wittenberger, S. J. 1999, Tetrahedron Lett., pp. 7175-7178.

43. Chu, W. 2005, Bioorg. Med. Chem. , pp. 77-87.

44. High Performance Liquid Chromatography: A short review. Bansal, V. 2010, Journal of Global Pharma Technology Vol.2 No.5, pp. 22-26.

45. Skoog, Douglas A., Holler, F. James e Nieman, A. Timothy. Principles of Instrumental Analysis. USA : Thomson Learning , 1998, p. 726.

46. Retention mechanisms of bonded-phase liquid. Dorsey, J.G., Cooper, W.T. 1994, Anal. Chem. 66, pp. 857A-867A.

47. Blau, Karl. Handbook of Derivatives for Chromatography. s.l. : Willey & Sons, 1993.

48. Derivatization Reagents for Chromatography Applications. Sigma-Aldrich. [Online] 1 de 2012. [Citação: 5 de 2 de 2013.] <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/migrationresource4/Derivatization%20Rgts%20brochure.pdf>.

49. Krishnan, Lalitha. Methods of Purifying Tigecycline. US2007/0049561 A1 United States, 1 de Março de 2007.
50. Synthesis of strombine. A new method for Monocarboxymethylation of primary amines. Kihlberg, Jan. Suecia : s.n., 1983, Acta Chemica Scandinavica, pp. 911-916.
51. A mild and efficient method for the one-pot monocarboxymethylation of primary amines. Gibbs, Timothy J. K. 2007, SYNLETT, Vol. 10, pp. 1573-1576.
52. Synthesis and Characterization of Cyclic Brush-Like Polymers by N-Heterocyclic Carbene-Mediated Zwitterionic Polymerization of N-Propargyl N-Carboxyanhydride and the Grafting-to Approach. Lahasky, Samuel H. s.l. : ACS Publications, Novembro de 2011, Macromolecules, Vol. 44, pp. 9063-9074.
53. Peptoids bearing tertiary amino residues in the n-alkyl side chains: synthesis of a potent inhibitor of Semaphorin 3A. Messenguer, Joaquim. s.l. : Elsevier, 2010, Tetrahedron, pp. 2444-2454.
54. Synthesis and characterization of cis-4-decenoyl-CoA, 3-phenylpropionyl-CoA, and 2,6-dimethylheptanoyl-CoA. Hoppel, Charles L., Minkler, Paul E. e Sobhi, Hany F. s.l. : ELSEVIER, 2010, Analytical Biochemistry , Vol. 401, pp. 114-124.
55. Fuller, W.D. e Yalamoori, V.V. Thieme Chemistry. [Online] [Citação: 14 de Março de 2013.] [http://www.thieme-chemistry.com/fileadmin/Thieme/HW-100/pdf/april/Fuller\\_ZAV.pdf](http://www.thieme-chemistry.com/fileadmin/Thieme/HW-100/pdf/april/Fuller_ZAV.pdf).
56. Anderson, G.W., Zimmerman, J.E. e Callahan, F.M. 1967, J. Am. Chem. Soc, Vol. 89, pp. 5012-5017.
57. A mild and effective procedure for the preparation of acid chlorides from carboxylic acids. Jang, Doo Ok. 1999, Tetrahedron Letters, Vol. 40, pp. 5323-5326.
58. A Convenient One-Pot Method for the Synthesis of N-Methoxy-N-methyl Amides from Carboxylic Acids. Jang, Doo Ok. Korea : s.n., 2010, Bull. Korean Chem. Soc., Vol. 31, pp. 171-173.
59. Atmos. Environ. Atkinson, R. 1992, Vol. 26A, pp. 1187-1230.
60. CONFIDENCIAL
61. Cottrell, T.L. The Strengths of Chemical Bonds. London : Butterworths, 1958.

62. Good Manufacturing Practice For Active Pharmaceutical Ingredients . International Conference on Harmonisation of Technical Requirements For Registration of Pharmaceuticals for Human Use. [Online] [Citação: 21 de 12 de 2012.]

[http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q7/Step4/Q7\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q7/Step4/Q7_Guideline.pdf).

63. Barbosa, Dália. Síntese de pirrolo [1.2-c]tiazóis via ciclo-adição 1,3-dipolar. Coimbra : s.n., 2001. Tese de Mestrado.

64. A student synthesis of the housefly sex attractant. Cormier, Russell. 5 de Maio de 1979, Journal of Chemical Education, Vol. 56, pp. 345-347.

65. Ratnam, Rakesh. Process for the production of a chlorinating reagent and its use in the preparation of chlorinated sugars. WO/2007/099557 India, 7 de Setembro de 2007.

66. CONFIDENCIAL

67. CONFIDENCIAL

68. CONFIDENCIAL

69. CONFIDENCIAL

70. CONFIDENCIAL

71. European, Commission. EudraLex - Volume 4 Good manufacturing practice (GMP) Guidelines. European commision. [Online] 13 de Setembro de 2012. [Citação: 12 de Dezembro de 2012.] [http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4/index_en.htm).

72. National Institute of Standards and Technology. [Online] [Citação: 10 de Janeiro de 2013.] <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?Scan=cob2361&Type=IR>.